Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. v. Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, J. Bang-Lund, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Bredig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, R. Kobert-Rostock, M. Kumagawa-Tokio, F. Landolt-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Berlin, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, F. Rochmann-Breslau, F. Rona-Berlin, S. Salaskin-St. Petersburg, N. Sieber-St. Petersburg, M. Siegfried-Leipzig, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Straßburg, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, A. J. J. Vandevelde-Gent, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Achtzigster Band.

1917.

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1917.

IVEES MUSEUM M

QP501
.B58
v.80

CHEMISTRY LIBRARY

CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge
zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, **F. Hofmeister**-Straßburg i. Els., **C. v. Noorden**-Frankfurt a. M., **E. Salkowski**-Berlin, **F. Tangl**-Budapest, **A. von Wassermann**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **J. Bang**-Lund, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **S. Flexner**-New York, **J. Forssman**-Lund, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **E. Friedberger**-Greifswald, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **F. Haber**-Berlin-Dahlem, **H. J. Hamburger**-Groningen, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **V. Henriques**-Kopenhagen, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **R. Kobert**-Rostock, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Berlin, **L. Michaelis**-Berlin, **H. Molisch**-Wien, **J. Morgenroth**-Berlin, **E. Münzer**-Prag, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **F. Rochmann**-Breslau, **P. Rona**-Berlin, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **O. Warburg**-Berlin, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Achtzigster Band.

M

Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1917.

IEFSMUSEUM AMSTERDAM

351257

QP501
.B58
v. 80

INDIANA UNIVERSITY
LIBRARY

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

12-16-40

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Schulemann, Werner. Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie 1

Stutzer, A. Ein Beitrag zur Biochemie der Pflanzen 143

Dernby, K. G. Die proteolytischen Enzyme der Pinguicula vulgaris 152

Bau, Arminius. Zur Frage der Konstitution des Amygdalins . . . 159

Rippstein, Erwin. Experimentelle Untersuchungen über das Wesen der Bergkrankheit 163

Pauli, Wolfgang und **Johann Matula.** Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide XXI. Über Silbersalzproteine 187

Chrząszcz, T. und **A. Joscht.** Über die Verschiebung einzelner amylolytischer Kräfte der Malzamylase und deren Verhalten beim Aufbewahren in Gegenwart verschiedener Reagentien 211

Brahm, C. Über Resorption und Umsatz abnorm großer Gaben von Rohrzucker und Invertzucker 242

Hasselbalch, K. A. Über die wahre Natur der „acidotischen Konstitution" des Neugeborenen 251

Asher, Leon. Beiträge zur Physiologie der Drüsen. XXIX. Abelin, J. Nachweis der Stoffwechselwirkung der Schilddrüse mit Hilfe eines eiweißfreien und jodarmen Schilddrüsenpräparates 259

Seite

Henriques, V. und **E. Christiansen.** Untersuchungen über den Ammoniakgehalt des Blutes. II. 297

Friedemann, Ulrich und **Alexandra Schönfeld.** Über die physikalisch-chemischen Bedingungen der Leukocytenbewegung. (Emigration der Leukocyten, Chemotaxis, Phagocytose) 312

Feigl, Joh. Zur Frage der Restreduktion des Blutes in Beziehung zu den reduzierenden Komponenten des Reststickstoffs. (Ergänzung). 330

Friedemann, Ulrich. Über heterophile Normalamboceptoren. Ein Beitrag zur Lehre von der Entstehung der normalen Antikörper . 333

Jacoby, Martin. Über Fermentbildung. II. 357

Unger, Rudolf. Über physikalisch-chemische Eigenschaften des isolierten Froschrückenmarks und seiner Gefäßhaut 364

Berichtigung 385

Autorenverzeichnis 386

Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie.

Von

Dr. phil. et med. Werner Schulemann.

(Aus der Königl. Chirurg. Klinik und dem Königl. Pharmazeut. Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 22. November 1916.)

Inhalt.

Seite

I. Vorwort 3
II. Goldmanns Vitalfarbstoffe 4
III. Seitenkettentheorie und Vitalfärbung 8
1. Die Seitenkettentheorie Ehrlichs 8
2. Die sauren Disazofarbstoffe im Lichte der Seitenkettentheorie 12
a) Trypanblau 12
b) Chemoceptoren und Vitalfärbungsvermögen 14
c) Lösungseigenschaften und Vitalfärbungsvermögen . . . 21
d) Seitenkettentheorie und Theorie der Farbstoffe 23
α) Theorie der Farbstoffe 24
β) Die Chemoceptoren im Lichte der Farbstofftheorie . 27
IV. Histologie der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen 28
1. Literatur 28
2. Was ist „Vitalfärbung“ 29
3. Wahl des Untersuchungsmaterials 30
4. Das histologische Bild bei der Färbung mit sauren Vitalfarbstoffen (Trypanblau) 31
5. Färbungsintervall bei Trypanblau 34
6. Vitalfärbung mit anderen Säurefarbstoffen 35
a) Mit kürzerem Färbungsintervall als Trypanblau . . . 35
b) Mit längerem Färbungsintervall als Trypanblau . . . 36
c) Kolloide Metallösungen und Farbstoffsuspensionen . . 37
7. Vitalfärbung mit:
a) Lithiumcarmin und freier Carminsäure 38
b) salzhaltigen und salzarmen Farbstoffen 38
c) warm und kalt bereiteten Farbstofflösungen 38
d) konzentrierten und verdünnten Farbstofflösungen . . . 39

Seite

8. Einfluß der Injektionsart auf die Vitalfärbung 39
a) bei Lösungen von Säurefarbstoffen 39
b) bei kolloiden Metallösungen 40
9. Die Reaktion des tierischen Organismus auf die Vitalfärbung 43
a) bei histologisch guten Vitalfarbstoffen (Lithiumcarmin, Trypanblau) 43
b) bei Farbstoffen mit kurzem Färbungsintervall 44
c) bei Farbstoffen mit langem Färbungsintervall 44
d) Der Einfluß der Injektionsart auf die Zellreaktion . . 44
10. Färbungsintervall und gefärbte Zellart 45

V. Physiko-chemische und biologische Eigenschaften der Säurefarbstoffe 46
1. Physiko-chemische Untersuchungsmethodik 46
a) Osmotischer Druck 46
b) Siedepunktserhöhung und Gefrierpunktserniedrigung . 47
c) Oberflächenspannung 47
d) Capillarer Aufstieg 47
e) Elektrolytfällung 48
f) Diffusionsgeschwindigkeit 51
α) Pergamenthülsen 51
β) Freie Diffusion 52
γ) Gelatinegel 52
2. Diffusionsgeschwindigkeit und Vitalfärbungsvermögen (Diffusionsgeschwindigkeit bestimmt von Herrn Dr. Wilborn) 52
a) Technik der physikalischen Versuche 52
b) Trypanblaureihe 60
c) Benzopurpurinreihe 69
α) Frische Lösungen 69
β) Alte Lösungen 72
γ) Agar-Agar-Gel 77
d) Harnstoffarbstoffreihe 80
α) Gelatinegel 80
β) freie Diffusion 81
γ) Pergamenthülsen 83
e) Verschiedene Farbstoffe 83
f) Kolloide Lösungen 85
3. Sulfonierungsgrad und Vitalfärbungsvermögen 87
Zusammenfassung 90

VI. Physikalische Chemie der Farbstoffe 92
1. Die Arbeiten von Hoeber, Ruhland, Küster und v. Möllendorff 92
2. Die Arbeiten von W. Biltz 93
3. Die Arbeiten von Rachlmann und Michaelis 99
4. Die Arbeiten von Hoeber 99
5. Kritik unserer physiko-chemischen Versuche 99
6. Schlußfolgerungen 102

Seite
VII. Natur und Genese der „Vitalfärbungsgranula“ . . . 104
1. Metachromasie bei Säurefarbstoffen 104
a) Chemische Eigenschaften (Indicatoren) 108
b) Physikalische Eigenschaften 109
2. Metachromasie der Farbstoffe und der Goldhydrosole . . 110
3. Kritik der Versuche 112
4. Genese der Granula 114
5. Natur der Granula 115
6. Speicherungsvermögen der vitalfärbbaren Zellen 116
7. Eigenschaften der gespeicherten Substanzen 119
a) physikalische 119
b) Größenverhältnisse 121
8. Phagocytose, amöboide Beweglichkeit, Vitalfärbung . . . 123
9. Oberflächenspannung und Vitalfärbung 129
VIII. Chemische Konstitution und Vitalfärbungsvermögen 133
IX. Zusammenfassung 137
X. Rückblick und Ausblick 140

I. Vorwort.

Im Herbst 1910 begann ich im Anschluß an die Arbeiten Goldmanns mit Untersuchungen über „die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen bei sauren Farbstoffen“ im Laboratorium von Herrn Geh. Rat Professor Keibel zu Freiburg. Die weitere Fortsetzung der Arbeiten erfolgte vom Herbst 1911 bis zum 1. August 1914 in den Kliniken und Instituten von Herrn Geh. Rat Professor Gadamer, Geh. Rat Professor Küttner und Herrn Professor Schmid in Breslau. Im Sommer 1912 hatte ich mich während einiger Monate bei Ausführung der Tierversuche der Mitarbeit von Professor Dr. Evans-Baltimore zu erfreuen; über die Ergebnisse der von ihm in Amerika fortgesetzten Versuche habe ich nichts erfahren. Die im Verlauf der Arbeit notwendig gewordene Messung der Diffusionsgeschwindigkeit zahlreicher Farbstoffe führte Herr Dr. Wilborn im Laboratorium von Herrn Geh. Rat Professor Dr. Schenck an der Technischen Hochschule zu Breslau aus.

Der Kriegsbeginn zwang dazu, die fast vollendete Arbeit abzubrechen. Obwohl noch manche Lücke auszufüllen wäre, obwohl mancher Kontrollversuch auszuführen wäre, habe ich mich doch entschlossen, die bisherigen Ergebnisse nunmehr zu veröffentlichen, da ich aus äußeren Gründen auch nach Kriegsschluß die Vitalfärbungsversuche nicht werde wieder aufnehmen

können. So wird manches Problem nur angedeutet, mancher Gedanke nur als Vermutung ausgesprochen werden können, der sonst experimentell bearbeitet worden wäre.

Auch muß ich darauf hinweisen, daß die vorliegende Arbeit nach den Versuchsprotokollen und Literaturnotizen ausgearbeitet wurde, die noch von Friedenszeiten her in meinem Besitz waren. Da in dem Ort meiner jetzigen Tätigkeit eine Bibliothek nicht vorhanden ist, kann die Berücksichtigung der Literatur nur eine sehr lückenhafte sein. So sehe ich von einer Literaturübersicht ganz ab und verweise nur auf die Arbeiten von Goldmann[1]), Groß[2]), Suzuki[3]), Kiyono[4]), Schulemann[5]), Möllendorff[6]), in denen der größte Teil der bis 1. VIII. 1914 erschienenen Arbeiten über Vitalfärbung zitiert ist.

II. Goldmanns Vitalfarbstoffe.

Da meine erste Arbeit[7]) über Vitalfärbung[8]) im Anschluß an die Untersuchungen Goldmanns[9]) geschah, bildeten die von ihm verwendeten Farbstoffe den natürlichen Ausgangspunkt für meine Versuche. Goldmann hatte mit Pyrrolblau, Isaminblau, Trypanblau und Trypanrot gearbeitet. Besonders war von ihm das Isaminblau verwendet worden. Aber nicht alle diese Farbstoffe waren für meine Zwecke von vornherein brauchbar.

---

[1]) E. Goldmann, Beiträge z. klin. Chir. **1909**, **1911**, **1912**.

[2]) Groß, Zieglers Beiträge **51**, 528, 1911.

[3]) Suzuki, Zur Morphologie der Nierensekretion. Jena 1912.

[4]) Kiyono, Die vitale Carminspeicherung. Jena 1914.

[5]) Schulemann, Arch. f. mikr. Anat. **79**, 1912; Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 11; Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **1912** und **1915**; Arch. d. Pharmazie **1912**, 252 und 389. — Schulemann, Evans und Wilborn, Jahrb. d. Schles. Ges. f. vaterl. Kultur **1913**; Deutsche med. Wochenschr. **1914**, Nr. 30. — Schulemann und Evans, Fol. haematol. **1915**, 207. — Schulemann und Coenen, Deutsche med. Wochenschr. **1915**, Nr. 41.

[6]) Möllendorff, Deutsche med. Wochenschr. **1914**, 1839; Anatom. Hefte (Merkel-Bonnet) **53**, 1915.

[7]) Schulemann, Arch. f. mikr. Anat. **79**, 1912.

[8]) Ich halte es für richtiger, den Begriff „Vitalfärbung" erst in einem späteren Kapitel zu definieren, da unter diesem Begriff zur Zeit viele Färbungsmethoden zusammengefaßt werden, die untereinander ganz verschieden sind.

[9]) Goldmann, Bruns Beiträge z. klin. Chir. **1909**.

Sollten Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen ergründet werden, so war ein Farbstoff zu wählen, von dem eine möglichst große Zahl naher Verwandter zur Verfügung stand.

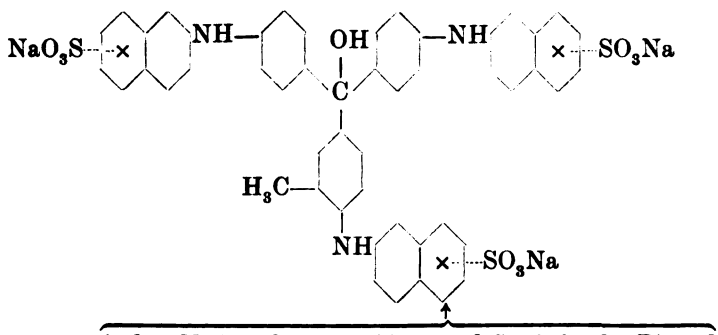
Pyrrolblau.

Das Pyrrolblau entpuppte sich nach den Angaben der darstellenden Firma (L. Cassella-Frankfurt a. M.) als nicht existierend. Dasselbe sollte identisch mit Isaminblau 6B sein.

Isaminblau.

Über Isaminblau gab mir Cassella keine genaue Auskunft. [Durch die Publikation der „Farbstofftabellen" von Schultz (Berlin 1914) wird Isaminblau unter Nr. 541 als Sulfurierungsprodukt von β-Naphthylrosanilin hingestellt.] (Genauere Angaben vgl. Protokoll Nr. 24a.) Als Vitalfarbstoff ist Isaminblau recht schlecht zu brauchen, wie die folgenden Versuchsprotokolle Nr. 24a und b zeigen:

Nr. 24a. Isaminblau 6B (Cassella).



Andere Marken des Isaminblaus sind Gemische der Di- und Trinaphthylrosanilin-di- u. trisulfonsäure, während Marke 6B das bezeichnete einheitliche Produkt ist. Je grüner ein Farbstoff ist, desto mehr Trinaphthylrosanilintrisulfonsäure enthält er.

Kaninchen. 1%ige Lösung intravenös 20 ccm am 31. VIII. 12.

Das Tier stirbt sofort unter den Erscheinungen der Embolie.

Sektion: Leber tiefblau. Herz dilatiert. Das Blut enthält Flocken des Farbstoffes. Lunge hellblau mit wenigen rosafarbenen Inseln. Niere schwach blau. Milz farbfrei. Gehirn schieferblau. Därme schwachblauer Ton.

Mikroskopische Untersuchung: Embolie der Pfortaderäste. Peritoneale Elastika schwach hellblau. Die Lebercapillaren sind gefüllt mit amorphen, rotvioletten Massen, in denen auch ab und zu reinblaue Körn-

chen liegen. Embolie der Capillaren des Gehirns, die teilweise noch mit gefärbter Gelatine injiziert erscheinen. Ihr Lumen ist durch rotviolette, miliare Thromben verschlossen, die wieder blaue Körnchen enthalten. In den Lungencapillaren nahezu vollständige Gefäßinjektion durch die Thromben, die violettblau erscheinen. Herz: violette Thrombose aller Capillaren. Niere: Farbkörnchen in den Gefäßen der Glomeruli und in den Blutcapillaren des Markes und der Rinde. Die Thromben sind rotviolett und enthalten blaue Farbkörnchen. Knochenmark: farbfrei. Nebenniere: Thrombose vor allem im Mark. Milz: farbfrei.

Nr. 24b. Isaminblau (Cassella).

Genaue Angaben s. Protokoll 24a.

Weiße Maus. 0,5%ige Lösung, je 1 ccm intrap. am 14. IX. und 17. IX. 12.

16. IX. Leicht hellblau am Ohr.

17. IX. Färbung am ganzen Körper, mit Ausnahme von Schwanz, Ohren und Schnauze.

18. IX. Maus sterbend, daher getötet.

Ganz hellblau, nur Ohrenspitze und Schwanzspitze weiß. Bauchwand tiefblau. Wanderzellen der Bauchmuskulatur ++++++[1]). In der Peritonealhöhle schleimige Flüssigkeit, die reichlich Makrophagen enthält. Diese enthalten alle blaue Granula in allen Größen. Einige beherbergen sehr umfangreiche und auch feinere violette, homogene Massen im Protoplasma. Oft große Vakuolen, ohne allgemeine Färbung oder mit violetten Klumpen darin. Sehr oft finden sich Makr., die blaue Gr., violette Gr. und Vakuolen mit violetten Klumpen zugleich enthalten. Neben den Zellen findet sich in der Peritonealhöhle eine enorm starke Abscheidung feiner violetter, homogener Klumpen. Man findet alle Übergänge von phagocytierten violetten, homogenen Klumpen, die frei im Protoplasma liegen, gleiche Klumpen, die innerhalb Vakuolen mit farblosem Inhalt liegen, Vakuolen, die violette Klumpen und blaue Gr. in einer violetten Flüssigkeit enthalten, endlich freie blaue Gr. im Protoplasma.

Netz. Makr. ++++++. Verhalten sich wie die freien Makr.

Serosazellen +++++. Große violette Vakuolen!

Pankreas +++++. Feine blaue, staubförmige Gr. (kein Violett!) finden sich in den Wanderzellen, während die im Pankreas liegenden Makr. sich in ihrer Färbung wie die frei gefundenen verhalten.

Leber. Kupffersche Sternzellen +++++ mit blauen Gr. und außerordentlich großen Vakuolen (größer als Erythrocyten), mit blauen Farbteilchen darin. Kein Violett. Leberzellen diffus blau.

Milz +++. Feine grünlichblaue Gr. Enorm viel violette Niederschläge in derselben (oder vielleicht an ihrer Oberfläche?).

Niere +++. Feine staubförmige, blaue Gr. in den Tubuli contorti. Im Mark fadenförmige blaue Konkremente (frei in Lymphräumen?).

---

[1]) Die +-Zeichen sollen je nach ihrer Zahl den Grad der Färbungsintensität andeuten.

Ovarium +++. Staubförmige blaue Gr.
Th. l. gl. blaue und violette Gr. in Makr.
Thymus blaue Gr.
Lungen +, einige Zellen mit blauen Gr.
Herz-Ventrikel +++, staubförmige blaue Gr. Vielleicht einige violette Niederschläge in Capillaren.
W.-Z. der Kopfhaut +++, blaue Gr.

Intravenös injiziert, erzeugt Isaminblau sofort tödliche Embolien. Bei subcutaner Injektion kommt es zu lokaler Niederschlagsbildung, die von Entzündung gefolgt ist. Von dem angelegten Farbstoffdepot aus gehen allmählich Spuren in den Körperflüssigkeiten wieder in Lösung, und ganz langsam tritt allgemeine Färbung der Tiere ein. Wird öfter als alle 7 Tage injiziert, so geht ein großer Prozentsatz der Versuchstiere zugrunde. Ebensowenig hat sich dieser Farbstoff für intraperitoneale Injektionen geeignet (vgl. besonders Protokoll Nr. 24b). Wohl sind die endlich erhaltenen mikroskopischen Bilder sehr viel hübscher als die mit Trypanblau erzeugten, denn die entstehenden Farbstoffgranula sind feiner und regelmäßiger im Protoplasma verteilt, aber dafür hat das Isaminblau noch den Nachteil, recht schlecht fixierbar zu sein, sowie im Alkohol stark auszuziehen, so daß auch Paraffin- und Celloidineinbettung schwer oder gar nicht auszuführen ist. Ebenso ist eine Entkalkung des gefärbten Gewebes bei diesem Farbstoff unter Erhaltung der vitalen Färbung nicht möglich.

Trypanblau.

Das Trypanblau wird jedoch allen diesen Ansprüchen durchaus gerecht. Bezüglich der Einzelheiten der Technik der Vitalfärbung mit Trypanblau sei auf Schulemann[1]) verwiesen[2]).

Zudem liegt im Trypanblau[3]) ein chemisch ganz genau bekannter Disazofarbstoff vor. Es ist also ein Angehöriger derjenigen Farbstoffklasse, welche die weitaus größte Zahl verhältnismäßig leicht zugänglicher Vertreter aufweist.

---

[1]) Schulemann, Fol. haematologica **1915**, 207, Originale.

[2]) Vgl. auch dort wie Deutsche med. Wochenschr. **1914**, Nr. 30 die Bemerkungen zu den Behauptungen Aschoffs und Kiyonos, daß Trypanblau zur Vitalfärbung wenig geeignet sei.

[3]) Konstitution vgl. Schultz, Farbstofftabellen, Nr. 391.

Trypanrot.

Trypanrot ist ein naher Verwandter des Trypanblaus. Es färbt wie dieses vital, ist aber praktisch wenig brauchbar.

III. Seitenkettentheorie und Vitalfärbung.

Als ich mit den Arbeiten über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen begann[1]), stand ich unter dem Einfluß der von Ehrlich und Goldmann vertretenen Lehre, daß die vitale Färbung zurückzuführen sei auf chemische Vorgänge im Tierkörper, und daß es durch die Verwendung von Farbstoffen im Tierversuch möglich sein würde, „chemisch-biologische" Fragen mit Hilfe dieser „histochemischen" Methode zu lösen. Die experimentelle Arbeit aber zeigte mir, daß ich mich auf falschem Wege befand.

Bei der allgemeinen Anerkennung, deren sich Ehrlichs Seitenkettentheorie[2]) in medizinischen Kreisen erfreut, ist es notwendig, darzulegen, weshalb sie für die Erklärung der Vitalfärbungserscheinungen versagt.

1. Die Seitenkettentheorie Ehrlichs.

Toxine.

Auf Grund seiner serologischen Untersuchungen unterscheidet Ehrlich zwischen „haptophoren" und „toxophoren" Gruppen am Toxinmolekül. Unter den „haptophoren" Gruppen versteht er eine „Seitenkette", d. h. irgendeine reaktionsfähige Atomgruppe (Radikal) am Toxinmolekül. Bei der Bindung des Toxinmoleküls an die Körperzelle, den Parasiten, das Bakterium usw. tritt diese Gruppe in Reaktion mit einer entsprechenden „Seitenkette", dem „Receptor", der wieder als eine reaktionsfähige Atomgruppe an einem Molekül des Protoplasmas oder Kernes der betreffenden Zelle zu denken ist. Wenn nun das Toxinmolekül durch die Reaktion zwischen der haptophoren Gruppe des Toxins und dem Receptor der Zelle in das Gefüge der Zelle eingetreten ist, dann erst beginnt die toxophore Gruppe, unter der wir eine andere reaktionsfähige Seitenkette am Toxin-

[1]) Schulemann, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **1912**; Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 11; Arch. f. Pharmaz. **1912**.

[2]) Vgl. hierzu Ehrlich, Beiträge z. experim. Pathol. u. Ther. sowie die weiteren Arbeiten Ehrlichs über dieses Thema.

molekül zu verstehen haben, ihre Giftwirkung auszuüben. (Später kommt Ehrlich zu der Ansicht, daß auch haptophore und toxophore Gruppe zugleich in Aktion treten können.) Die Giftwirkung stellt sich Ehrlich wieder als Reaktion zwischen toxophorer Gruppe und „lebenswichtigen" Receptoren der Körperzelle vor.

Ehrlich hat seine Theorie dann weiter ausgedehnt, zunächst auf die Hypothese der Ernährung der Zellen.

Nährstoffe.

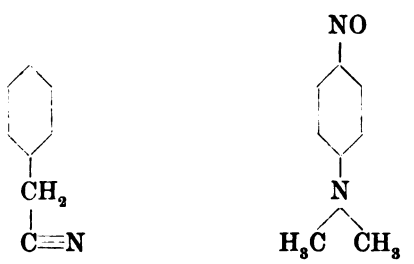
Nährstoffe enthalten nach ihm nur haptophore Gruppen. Wenn sie einmal mit Receptoren, die jetzt „Nutriceptoren" genannt werden, der Zellen reagiert haben, dann treten weitere Receptoren in Aktion, die nun den Abbau bzw. Umbau der Nährstoffe, d. h. ihre Assimilation, besorgen.

Tumoren.

Auch zur Erklärung des Wesens der malignen Tumoren wurde die Hypothese ausgebaut. Eine Steigerung der „Avidität" der Receptoren bestimmter Körperzellen, d. h. eine erhöhte Reaktionsfähigkeit derselben, soll eine gesteigerte Zufuhr von Nährstoffen und daher eine andere Verteilung derselben im Tierkörper zur Folge haben, so daß nun bestimmte Teile desselben auf Kosten des übrigen Körpers wachsen und Tumorbildung die Folge ist.

Reaktionsmodus der Seitenketten.

Als Beispiel für den Modus dieser Steigerung der Reaktionsfähigkeit der Receptoren wird von Ehrlich das Verhalten des



Benzylcyanides gegen p-Nitroso-dimethylanilin

benützt. Während die Kondensation bei diesen Körpern nur unter Erwärmen und bei Gegenwart freien Alkalis eintritt, vereinigen sie sich bei Verwendung von

p-Nitro-Benzylcyanid

sehr leicht in der Kälte, während

p-Amino-Benzylcyanid

schwerer als Benzylcyanid selbst reagiert[1]). Der „Receptor" $-CH_2-$ ist also durch eine andere „Seitenkette" ($-NO_2$ und $-NH_2$) in seiner Reaktionsfähigkeit beeinflußt worden. Diese Steigerung bzw. Verminderung der Reaktionsfähigkeit der Chemoceptoren wird dann auch zur Erklärung der „Arzneifestigkeit" herangezogen; doch wird diese auch so gedeutet, daß die arzneifest gewordenen Zellen bzw. Parasiten ihre „Receptoren" ganz verloren haben.

Farbstoffe und Arzneimittel.

Endlich hat Ehrlich gerade auf Grund von Vitalfärbungsversuchen seine Seitenkettentheorie auch noch auf die Theorie von Farbstoff- und Arzneimittelverteilung und Wirkung ausgedehnt. Nur heißen die haptophoren Gruppen jetzt „Chemo-

[1]) Die Kondensation verläuft nach dem Schema

$$(CH_3)_2N \cdot C_6H_4NO + H_2C\begin{matrix}CN\\C_6H_5\end{matrix} = (CH_3)_2NC_6H_4N = C\begin{matrix}CN\\C_6H_5\end{matrix} + H_2O$$

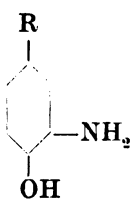
unter Bildung einer Azomethinverbindung (vgl. Ehrlich und Sachs, Ber. **32**, 2341, 1899; Sachs, Ber. **33**, 959, 1900; Sachs und Bry, Ber. **34**, 118, 1901; Sachs und Lewin, Ber. **35**, 3569, 1902; Ehrlich, Med. Woche **15**, 4, 1901).

ceptoren". Während es nicht möglich war, in den Toxinen und Zelleiweißmolekülen unbekannter chemischer Konstitution die haptophoren Gruppen genauer zu definieren, schien dies bei den Arzneistoffen bekannten chemischen Baues eher möglich. Der Name Chemoceptor sagt allein schon aus, daß Ehrlich darunter eine reaktionsfähige Atomgruppe im Molekül versteht, die mit den Receptoren der Zellen in chemische Reaktion, d. h. in Reaktionen nach den Prinzipien der formalen Valenzlehre, tritt, wie das ja am Beispiel der Kondensation: Benzylcyanid-p-Nitrosodimethylanilin hinreichend begründet ist. Die Einführung von „Seitenketten" kann nun die Reaktionsfähigkeit eines Chemoceptors verbessern oder herabsetzen, wie wir oben gesehen haben. So erscheine es möglich, durch Variationen der Seitenketten die Verteilung und pharmakologische Wirkung eines Arzneistoffes zu beeinflussen.

Salvarsan.

Solche Variationen sind in praxi bereits in ungeheurer Zahl ausgeführt worden[1]). Allgemeine Gesetzmäßigkeiten sind nur in äußerst geringer Zahl gefunden worden. Auch Ehrlich ist auf empirischem Wege über 605 Präparate zum Salvarsan gekommen, das durch das Experiment als eine optimal spirillozide Substanz gegenüber den anderen Präparaten aufgefunden wurde.

An seinem Beispiel soll nun Ehrlichs Theorie betrachtet werden[2]). Nach derselben liegen beim Salvarsan zwei Chemoceptoren (haptophore Gruppen) vor, nämlich die



„Orthoamidophenoloceptoren"[3]);

wie sie mit den auf sie abgestimmten Receptoren des Proto-

[1]) Vgl. z. B. S. Fränkel, Die Arzneimittelsynthese. Berlin 1912.

[2]) Vgl. hierzu Ehrlich, Aus Theorie und Praxis der Chemotherapie, S. 7ff. Leipzig 1911.

[3]) Worin R einen organischen Rest andeutet.

plasmas reagieren sollen, darüber gibt Ehrlich hier keinen Aufschluß. Nur der Ausdruck „Chemoceptoren" zeigt, daß die Reaktion wohl eine chemische sein soll[1]).

Der toxophoren Gruppe eines Toxins soll beim Salvarsan der

$$R—A_s=A_s—R$$

„Arsenoceptor"

entsprechen.

Nach Ehrlichs Theorie wäre also die Verteilung des Salvarsans von den „Orthoamidophenoloceptoren", seine Wirkung von dem „Arsenoceptor" abhängig.

Farbstoffe.

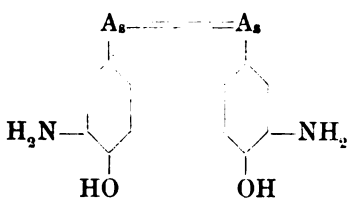
Für die Farbstoffe erklärt Ehrlich[2]) selbst, daß die Haftfestigkeit von löslichen Farbstoffen in den Zellen des Tierkörpers eine ganz verschiedene sei. Einige „durchfliegen" als „Zellspringer" den Körper, andere bleiben als „Zellhafter" wochen- und monatelang im Körper nachweisbar; und das alles soll entsprechend der eben entwickelten Theorie durch die „Bindungsfestigkeit zwischen Chemoceptor und Receptor" bedingt sein.

2. Die sauren Disazofarbstoffe im Lichte der Seitenkettentheorie.

a) Trypanblau.

Salvarsan und Trypanblau.

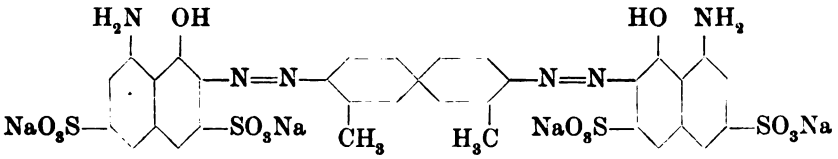
Diese Anschauungen wandte ich zunächst auf das Trypanblau auch an.



Salvarsan

[1]) Ehrlich, l. c. S. 8, spricht auch von der Entstehung einer „Verbindung".

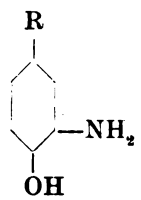
[2]) Siehe Fußnote 2 auf voriger Seite.



Trypanblau

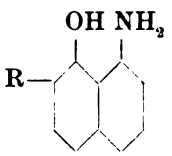
Trypanblau und Salvarsan zeigen in ihrer chemischen Konstitution viele Ähnlichkeiten. Den ortho-ständigen —NH_2- und —OH-Gruppen am Phenylrest des Salvarsans entsprechen beim Trypanblau die peri-ständigen gleichen Gruppen an den Naphthalinringen. Der Arsenogruppe des Salvarsans entspricht die Azogruppe des Trypanblaus, in dem sie aber zweimal vorhanden ist.

Es schien also verlockend, dem



Orthoamidophenoloceptor

des Salvarsans den



Periamidonaphtholoceptor

des Trypanblaus, dem

$$R—As=As—R$$

Arsenoceptor

des Salvarsans den

$$R—N=N—R$$

Azoceptor

des Trypanblaus gegenüberzustellen.

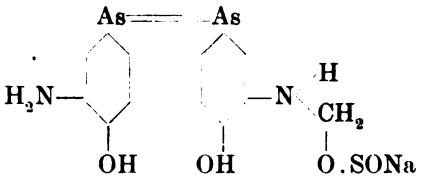
Neosalvarsan und Trypanblau.

Ein prinzipieller Unterschied zwischen den beiden Substanzen bestand aber darin, daß das Trypanblau vier —SO_3Na-Gruppen enthielt, die dem Salvarsan fehlten. Salvarsan ist

eine kationische Verbindung[1]), wäre also den basischen Farbstoffen zur Seite zu stellen, während Trypanblau ein Säurefarbstoff ist. Dieser Unterschied wird aber dadurch ausgeglichen, daß im Neosalvarsan ein anodischer Abkömmling des Salvarsans dargestellt wurde, der genau wie Salvarsan wirkt[2]). Neosalvarsan entsteht aus Salvarsan durch Vereinigung mit 1 Mol formaldehydsulfoxylsaurem Natrium nach der Gleichung:

$$R-NH_2+HO.CH_2.O.S.ONa=R-NH.CH_2.O.S.ONa+H_2O,$$

hat also die Konstitution:



Neosalvarsan[3])

Da ferner mit wachsendem Molekulargewicht bzw. größerer Atomzahl das Farbstoffmolekül schwer löslich wird, schien mir die Anwesenheit von vier $-SO_3Na$-Gruppen, die im wesentlichen erhöhend auf die Löslichkeit wirken, das Dasein des Tolidinrestes im Trypanblau nur zu kompensieren.

b) Chemoceptoren und Vitalfärbungsvermögen.

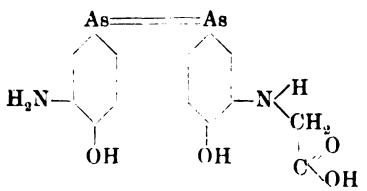
Theoretisch wäre daher — wenn die Seitenkettentheorie auch bei den sauren Disazofarbstoffen Gültigkeit hätte — zu erwarten gewesen, daß Änderungen im Aufbau und der Stellung der haptophoren Gruppen (dem Periamidonaphtholoceptor) im Trypanblau Hand in Hand gehen würden mit dem biologischen Verhalten der Farbstoffe.

---

[1]) Vgl. hierzu Traube, Kolloidchem. Beihefte **3**, 317 und 321, 1912.

[2]) Stühmer, Deutsche med. Wochenschr. **1912**, 983.

[3]) Ähnliche anodische Salvarsanderivate wurden den Farbwerken M. L. Br.-Höchst patentiert, z. B. D.R.P. 250745, 18. III. 1911; ausgeg. 13. IX. 1912:



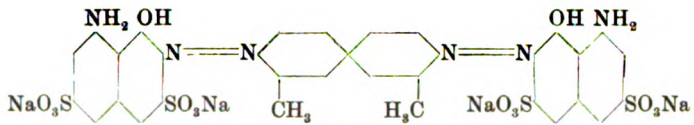
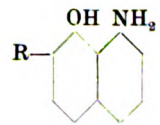
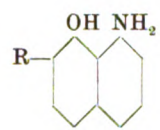
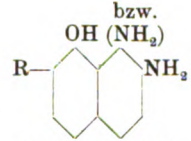
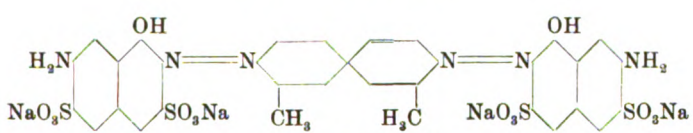
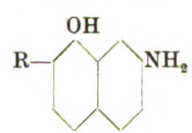
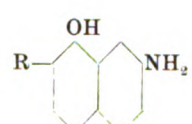
In Wirklichkeit aber stellen sich die Verhältnisse ganz anders dar. (Siehe Tabelle I.)

Diaminblau 2B färbt wie Trypanblau vital, obwohl ihm zwei Methylgruppen fehlen. Im Diaminschwarz B H ist nur noch ein Periamidonaphtholoceptor vorhanden, in der anderen „Seitenkette" ist die Aminogruppe von C_1 nach C_2 gewandert. Der unsymmetrische Farbstoff färbt gleichwohl vital. Bei Farbstoff Nr. 224 ist der Trypanblaureceptor nicht mehr vorhanden, trotzdem bleibt der Farbstoff vitalfärbend. Ihm gegenüber hat das Diaminschwarz RO das Vitalfärbungsvermögen verloren. Obwohl im Chicagoblau R der Periamidonaphtolozeptor wiederhergestellt ist, färbt auch dieser Farbstoff nicht vital. Zum Vitalfarbstoff ist das Diaminschwarz RO wieder geworden, wenn ihm die Konstitution des Farbstoffes Nr. 227 gegeben wird. Im Oxaminblau 3 R lernen wir nun wieder einen nicht vital färbenden Disazofarbstoff kennen, bei dem im Trypanblaureceptor die Aminogruppe von C_1 nach C_3 verschoben ist. Dieser scheinbar „negative" Receptor wird aber in Farbstoff Nr. 228 wieder „positiv", d. h. Farbstoff Nr. 228 färbt vital. Dianilblau B beweist, daß auch ein Ersatz der Aminogruppe im Periamidonaphtholoceptor durch eine zweite Hydroxylgruppe das Vitalfärbungsvermögen des Trypanblaus nicht verändert. Ebenso kann die Hydroxylgruppe des Trypanblaus ganz verschwinden. Benzopurpurin B färbt vital; hingegen ist Congo, das einen ganz ähnlichen Receptor wie Benzopurpurin besitzt, ohne Vitalfärbungsvermögen.

Bei Farbstoff 168, 172, 246, 247, 167, die sämtlich vital färben, sehen wir, daß das Tolidin bzw. Benzidin ohne Schaden durch den Diphenylharnstoff ersetzt werden kann, wir lernen auch eine weitere Reihe neuer „positiver" Receptoren kennen. Die „Seitenketten" des Farbstoffes Nr. 167 zeigen sogar überhaupt keine „Receptoren". Im Farbstoff Nr. 155 haben wir ein Derivat des Stilbens vor uns, das die gleichen „Seitenketten" wie Trypanblau aufweist und auch vital färbt. Der schöne Vitalfarbstoff Baumwollponceau R zeigt wieder ein neues Mittelglied und einen neuen Chemoceptor.

Es ist sogar nicht einmal nötig, bei den Disazofarbstoffen stehen zu bleiben. Sonnengelb, Isaminblau 6 B, Methylblau für Seide, Violamin und viele andere Farbstoffe mehr zeigen, daß Vitalfarbstoffe in allen möglichen Farbstoffklassen vorkommen.

Tabelle I.

Konstitutionsformel des Farbstoffes	Theor. Chemoceptor	Vital-färbungs-vermögen
 Trypanblau		+
Diaminblau 2B		+
Diaminschwarz BH	bzw.  unsymmetrisch	+
 Farbstoff Nr. 224		+
Diaminschwarz RO		–

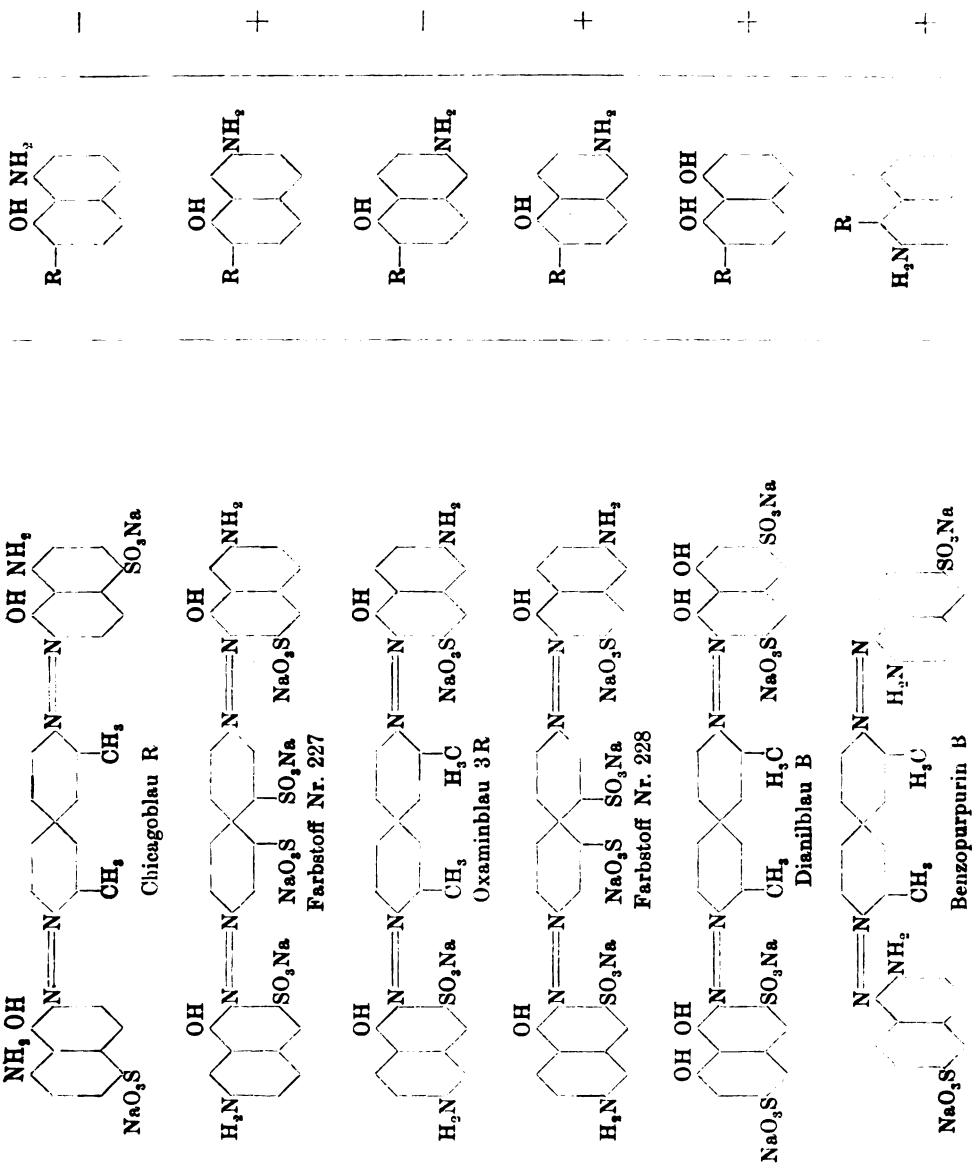
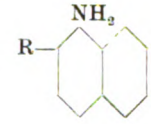
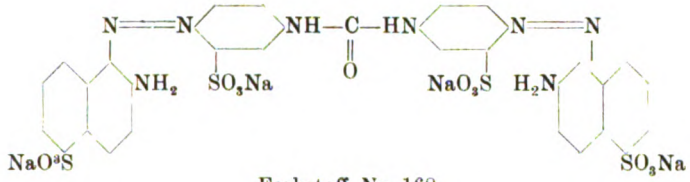
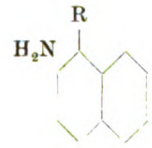
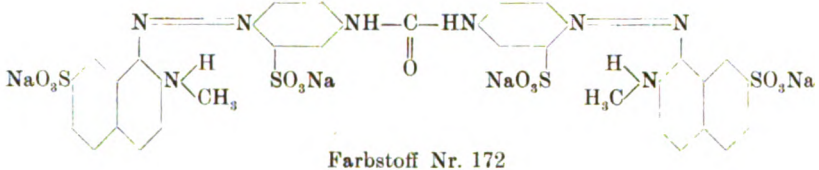
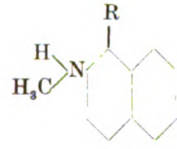
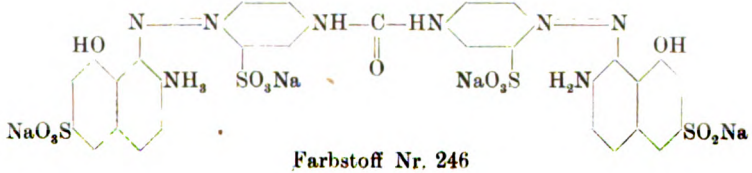
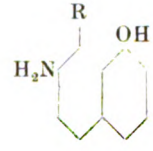

Chicagoblau R
Farbstoff Nr. 227
Oxaminblau 3 R
Farbstoff Nr. 228
Dianilblau B
Benzopurpurin B

Tabelle I (Fortsetzung).

Konstitutionsformel des Farbstoffes	Theor. Chemoceptor	Vital-färbungs-vermögen
Congo		–
 Farbstoff Nr. 168		+
 Farbstoff Nr. 172		+
 **Farbstoff Nr. 246**		+

+	+	+	+	+
		Keine Chemoceptoren!		

Farbstoff Nr. 247

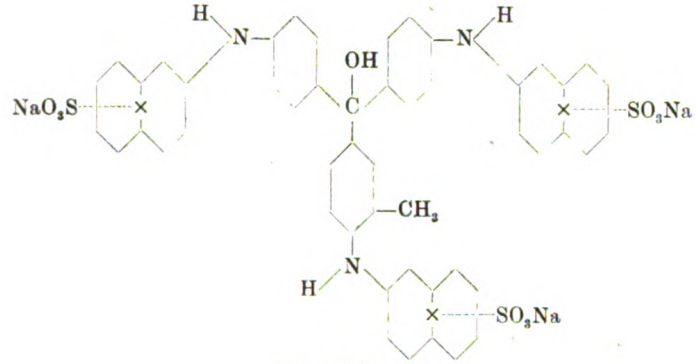
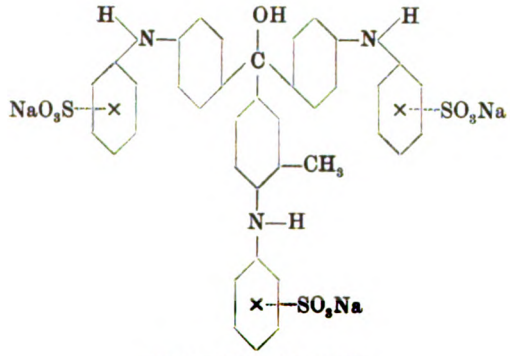
Farbstoff Nr. 167

Farbstoff Nr. 155

Baumwollponceau R

Sonnengelb

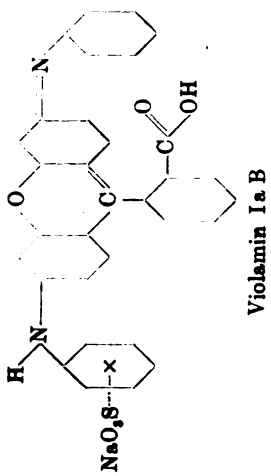
Tabelle I (Fortsetzung).

Konstitutionsformel des Farbstoffes	Theor. Chemoceptor	Vital-färbungs-vermögen
 Isaminblau 6 B		
 **Methylblau für Seide**		

Diese kleine Zusammenstellung, die ich durch weitere Beispiele noch ganz bedeutend erweitern könnte, zeigt bereits zur Genüge, daß die **„Seitenkettentheorie" hier vollständig versagt. Die heterogensten Chemoceptoren bewirken das gleiche, und Farbstoffe mit gleichen Chemoceptoren können sich biologisch völlig verschieden verhalten.** Ja sogar die tiefgreifendsten Änderungen der chemischen Konstitution sind oft ohne jeden Einfluß auf das Vitalfärbungsvermögen der Farbstoffe.

c) Lösungseigenschaften der Farbstoffe und Vitalfärbungsvermögen.

Mit der Seitenkettentheorie ist hier also nicht weiterzukommen. Die genauere Betrachtung der Tabelle I aber gibt bereits einen Hinweis auf neue Gesichtspunkte:



Violamin Ia B

Im Trypanblau sind 4 Sulfonsäuregruppen enthalten, im Chicagoblau, das ihm sonst völlig gleicht, finden sich nur 2 solche Gruppen. In derselben Weise sind gegenüberzustellen

Diaminschwarz RO und Farbstoff Nr. 227,
Oxaminblau 3R und Farbstoff Nr. 228.

Die Farbstoffe mit 4 Sulfonsäuregruppen färben vital, die mit 2 hingegen nicht. Von der Zahl dieser Gruppen allein aber hängt das Vitalfärbungsvermögen nicht ab. Benzopurpurin 6B mit nur 2 Sulfonsäuregruppen färbt wieder vital. Hingegen

färbt Congo, das auch nur 2 Sulfonsäuregruppen besitzt, nicht vital.

Die Verhältnisse liegen also wesentlich komplizierter. Sie sollen weiter unten ausführlich dargelegt werden. Erinnern wir uns aber daran, daß die Wasserlöslichkeit der Disazofarbstoffe in hohem Maße von der Anwesenheit von Sulfonsäuregruppen als salzbildenden Gruppen abhängt, so ist der Weg zur Weiterarbeit schon einigermaßen angedeutet.

Beobachtungen bei Ausführung der Tierversuche leiten in die gleiche Richtung. Bei einer großen Zahl von Farbstoffen (Benzopurpurin B, Dianilblau 4 R, Toluylenrot RT und vielen anderen mehr) zeigte sich, daß das Vitalfärbungsvermögen in hohem Maße abhängig sein kann von der Vorgeschichte der Farbstofflösung, ihrer Konzentration, ihrem Elektrolytgehalt u. a. m. So wurde eine kalt bereitete frische 0,5 %ige Lösung von Benzopurpurin [1]) intravenös von Kaninchen gut vertragen und gab gute vitale Färbung. Wurde aber die gleiche Lösung desselben Farbstoffes kurz erhitzt, wurde sie heiß bereitet oder wurde eine alte oder eine konzentriertere Lösung verwendet, so kam es zu tödlichen Embolien. Embolien erzeugte auch das Handels-Trypanblau in Ringerlösung gelöst, während Lösungen in destilliertem Wasser intravenös ganz glatt vertragen wurden [2]). Bei den Farbstoffen Nr. 150 (o-Benzidinmonosulfonsäure + 2 Mol. 2-Amido-8-naphthol-6-sulfonsäure alcal. gekuppelt), Nr. 151 (o-Benzidin monosulfonsäure + 2 Mol 2-Amino-5-naphthol-7-sulfonsäure alcal. gekuppelt) und Nr. 154 (Tolidin alcal. gekuppelt mit 1 Mol 1,8-Dioxynaphtalin-3,6-disulfonsäure und sauer gekuppelt mit 1 Mol 1,8-Diamidonaphthalin-4-sulfonsäure) entstand bei intraperitonealer Injektion einer 1 %igen Lösung bei Meerschweinchen keine Allgemeinfärbung, während häufige Injektionen kleiner Mengen 0,5 %ige Lösung doch noch Vitalfärbung erzielten.

Äußerst charakteristisch verhält sich die Carminsäure. Sie ist als freie Säure in Wasser unlöslich. Ihre Anreibung, in Wasser intraperitoneal injiziert, gibt keine Vitalfärbung. Die suspendierten Carminsäureteilchen werden phagocytiert von all den

---

[1]) Cf. Schulemann, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1912.

[2]) Vergl. auch Groß, Zieglers Beiträge **51**, 528, 1911.

Zellen (natürlich nur solchen, die zu phagocytieren vermögen) zu denen sie mechanisch gelangen können.

Das Lithiumsalz der Carminsäure ist hingegen wasserlöslich und liefert injiziert eine prachtvolle vitale Färbung [1]).

Ehrlich hat bereits darauf hingewiesen, daß Benzopurpurin sehr dazu neige, Molekülaggregate zu bilden und in kolloide Lösung überzugehen. Er ist aber der Ansicht, daß andere Vitalfarbstoffe als Elektrolyte gelöst seien. Das Benzopurpurin nehme unter den Säurefarbstoffen eine besondere Stellung als Kolloide ein, während sonst die Kolloidchemie auf die anderen Farbstoffe zur Erklärung ihrer biologischen Eigenschaften nicht angewendet werden könne.

Ein anderer Einwand könnte gegenüber der im vorigen gewonnenen Erkenntnis gemacht werden, daß das Vitalfärbungsvermögen der Farbstoffe von ihrem Lösungszustand abhänge. Es wäre die Deutung möglich, daß ein geeigneter Lösungszustand nur eine Bedingung für die Verteilung der Farbstoffe sei, daß erst ein bestimmter Lösungszustand erreicht werden müsse, um das Farbstoffmolekül an die Stellen im tierischen Körper gelangen zu lassen, wo nun doch schließlich die endgültige Ablagerung des Farbstoffes durch eine Reaktion der „Chemoceptoren" geschehe [2]). Dann würden Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Lösungszustand und Vitalfärbungsvermögen nur die Bedingungen zutage fördern können, unter denen die Chemoceptoren in Reaktion treten.

Auch diese Behauptung kann nicht zutreffend sein.

Wir sahen bereits in Tabelle I, daß Farbstoffe mit den heterogensten Chemoceptoren die gleichen biologischen Eigenschaften haben, wenn nur der Lösungszustand der richtige ist.

d) Seitenkettentheorie und Theorie der Farbstoffe.

Es ist nun ferner noch zu bedenken, daß wir es mit Farbstoffen hier zu tun haben und daß gerade die von Ehrlichs Theorie als Chemoceptoren bezeichneten „reaktionsfähigen"

---

[1]) Cf. auch Ribbert, Verworns Zeitschr. f. allgem. Physiol. 4, 1904.

[2]) Ein Standpunkt, den ich in gewisser Weise früher selbst innehatte. Cf. Schulemann, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1912.

„Seitenketten" in den Farbstoffen als Chromophore und Auxochrome wirken.

α) Theorie der Farbstoffe.

Nach der von Graebe und Liebermann[1]) aufgestellten, von Witt[2]) ausgebauten Theorie, die von vielen anderen Forschern[3]) dann außerordentlich erweitert und vertieft wurde, ist der Farbstoffcharakter einer Verbindung abhängig von der Funktion Chromophor $\times$ Auxochrom. Chromophore werden solche ungesättigten Atome oder Atomgruppen genannt, deren Einführung in ein farbloses Molekül Absorption im sichtbaren Teile des Spektrums hervorruft. Solche chromophorhaltigen Verbindungen werden als Chromogene bezeichnet. Sie sind gefärbt, haben aber noch keinen Farbstoffcharakter, d. h. noch keine Affinität zur Textilfaser. Eigentliche Farbstoffe entstehen erst durch den Eintritt von Auxochromen in das Chromogen. Als Auxochrome kommen im wesentlichen die Aminogruppe und substituierte Aminogruppen sowie die Hydroxylgruppe in Betracht. Farbstoffe können auch durch Häufung mehrerer Chromophore in einem Chromogen entstehen. Der Eintritt des Auxochroms in das Chromogen hat 1. eine Verschiebung der Absorptionsgrenzen zur Folge; 2. verleiht er der Verbindung Affinität zur Faser. Diese neuen Eigenschaften sind durch eine Einwirkung des Auxochroms auf das Chromophor entstanden, und zwar kann der Eintritt des Auxochroms in das Chromogen zur Folge haben 1. eine intramolekulare Umlagerung durch Bildung eines neuen Chromophors, z. B. eines Chinones; 2. eine Fernwirkung auf das Chromophor durch einen Affinitätsaustausch zwischen Auxochrom und Chromophor. Jeder Eingriff in diese Funktion Auxochrom $\times$ Chromophor pflegt von einer Änderung der Lichtabsorption des Farbstoffes gefolgt zu sein. Solche Änderungen entstehen fast durch jede Veränderung der Konstitution der Farbstoffe. Die Wirkung kann entweder eine

---

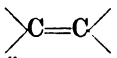
[1]) Graebe und Liebermann, Berichte 1, 104.

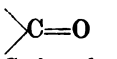
[2]) Witt, Ber. 9, 522.

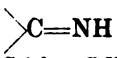
[3]) Kauffmann, Ahrens' Samml. chem. u. chem.-techn. Vorträge. 9. Stuttgart, Enke. — Ley, Farbe und Konstitution. Hirzel., Leipzig 1911. — Kauffmann, Valenzlehre. Stuttgart 1911 — Bucherer, Farbenchemie. Leipzig 1914.

bathochrome sein, d. h. eine Verschiebung der Lichtabsorption von Ultraviolett nach ultrarot (farbvertiefend) oder eine hypsochrome, d. h. eine Verschiebung der Absorption im umgekehrten Sinne[1]).

Einige Beispiele mögen dies erläutern[2]). Als Chromophore sind erkannt:

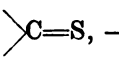
1. 
Äthylengruppen (in bestimmter Zahl und Lagerung).

2. 
Carbonylgruppen.

3.  bzw. —CHN
Stickstoff-Kohlenstoffgruppierungen.

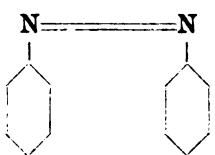
4. —N=N—
Azogruppen.

6.
Nitrogruppen.

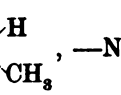
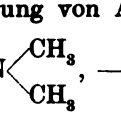
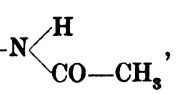
7.  , —C—S_2—C— u. a. m.
Schwefelhaltige Gruppen.

8. Metalloide Atome wie J, Br u. a. m.

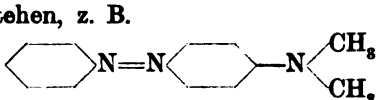
Ein Beispiel eines Chromogens ist das


Azobenzol,

aus dem durch Einführung von Auxochromen wie

—NH_2,  ,  ,  , —OH u. a. m.

Farbstoffe entstehen, z. B.


Dimethylaminoazobenzol,

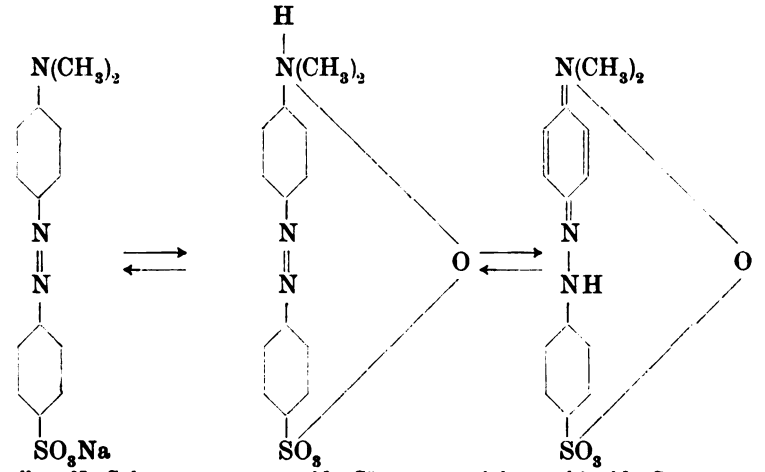
in dem die Dimethylaminogruppe durch Fernwirkung auf die Azogruppe den Farbstoffcharakter erzeugt.

---

[1]) Schütze, Zeitschr. f. physik. Chem. 9, 109.

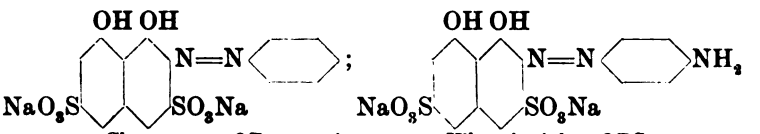
[2]) Zit. n. Ley, l. c., S. 20.

Im Helianthin hingegen haben wir einen Farbstoff vor uns, in dem unter bestimmten Verhältnissen die Fernwirkung Auxochrom $\times$ Chromophor in eine intramolukulare Umlagerung vor sich gehen kann[1]):



gelbes Na-Salz — orange azoide Säure — violette chinoide Säure

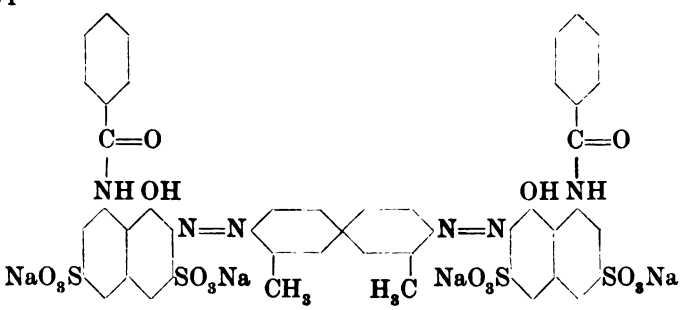
Eine bathochrome Änderung stellt z. B. der Übergang des



Chromotrop 2R in Viktoriaviolett 8BS

dar. Durch Einführung einer —NH_2-Gruppe ist der rote Farbstoff in einen violetten übergegangen.

In der Überführung des Trypanblaus in das N-Benzoyl-Trypanblau:



N-Benzoyltrypanblau

[1]) S. die Arbeiten von Hantzsch, Ber. 41, 1171.

lernen wir einen hypsochromen Vorgang kennen. Während Trypanblau Baumwolle blau färbt, wird sie von N-Benzoyl-Trypanblau violett gefärbt.

Der Vergleich von Ehrlichs Seitenkettentheorie mit der Theorie der Farbstoffe lehrt also, daß von Ehrlich gerade die Atomgruppen als Seitenketten bezeichnet werden, die als Chromophore oder Auxochrome in den Farbstoffen wirken.

β) Die Chemoceptoren im Lichte der Farbstofftheorie.

Im Trypanblau wäre das Chromogen —N=N— als der eine Receptor anzusprechen, die Auxochrome —NH_2 und —OH als haptophore Gruppen. Im Salvarsan — einem gelben Farbstoff — ist das Chromophor (die Arsenogruppe —As=As—) die toxophore Gruppe, die Auxochrome —NH_2 und —OH sind die haptophoren Receptoren.

Die Auxochrome entsprechen also den haptophoren Gruppen Ehrlichs. Veränderungen in den Auxochromen führen nach der Theorie der Farbstoffe Veränderungen der Farbe herbei. Wenn also die Seitenkettentheorie richtig wäre, müßte bei der Vitalfärbung — bei der Ehrlich ja chemische Bindung der haptophoren Gruppen an Zellbestandteile annimmt — Farbänderung auftreten. Das Experiment aber zeigt, daß bei der Ablagerung saurer Farbstoffe in den Zellen solche Änderungen der Nuance fast niemals auftreten.

Trypanblau zeigt z. B. in der Zelle seine frühere blaue Farbe. Daß allein schon eine chemische Änderung der —NH_2-Gruppen eine Änderung der Nuance zur Folge hat, ist eben am violetten N-Benzoyltrypanblau gezeigt worden. Trypanblaufärbungen im Tier zeigten niemals einen Übergang nach Violett oder gar Rot.

In den wenigen Fällen, wo doch eine Farbänderung bei der Ablagerung in den Zellen zu beobachten war (Metachromasie[1]), ließ sich stets der genaue Nachweis führen, daß sie nicht durch chemische Einflüsse entstanden. Es war mir im Gegenteil möglich, mit Hilfe solcher metachromatischer Färbungen den direkten Beweis zu erbringen, daß die Vitalfärbung mit

[1]) Ein in der medizinischen Literatur üblicher Ausdruck für Farbenänderung eines Farbstoffes bei histologischen Färbungen.

sauren Farbstoffen auf Änderungen des Lösungszustandes der Farbstoffe beruht und die Vitalfärbung ein biophysikalischer und kein biochemischer oder histochemischer Vorgang ist (cf. später). Ebenso kann durch diese Versuche gezeigt werden, daß auch Adsorption (wie bei der Baumwollfärbung[1]) oder Bildung einer festen Lösung bei der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen keine Rolle bei der Bildung der Granula spielt.

Es beweist also auch die Betrachtung der Seitenkettentheorie Ehrlichs im Lichte der Theorie der Farbstoffe, daß chemische Reaktionen nicht die Farbstoffe an Zellbestandteile binden können.

IV. Histologie der Vitalfärbung.

1. Literatur.

Eine Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen erzielte zuerst Ribbert[2]) durch Anwendung des Lithiumsalzes der Carminsäure. Diese Versuche erweiterte später Schlecht[3]). Unabhängig von diesen Arbeiten wurden die Versuche von Bouffard[4]) mit Trypanblau und von Goldmann[5]) mit Isaminblau und Trypanblau ausgeführt. Erst später wurde von Schulemann[6]) und Aschoff[7]) festgestellt, daß die Carminsäure- und Trypanblaufärbung die gleichen Resultate gibt. Weitere Einzelarbeiten folgten (vgl. bei Kiyono[8]) und Möllendorff[9]). Besonders hervorzuheben sind die groß angelegten, von Suzuki[10]) und Kiyono[11]) unter Aschoffs Leitung ausgeführten Arbeiten.

Weit geringer ist die Zahl der Arbeiten, die sich mit der Theorie der Vitalfärbung beschäftigen. Ehrlichs Arbeiten wurden bereits ausführlich gewürdigt. Auf Goldmanns An-

[1]) Vgl. Pelet-Jolivet, Die Theorie des Färbeprozesses. Dresden 1910. — Zsigmondy, Kolloidchemie. Leipzig 1912.

[2]) Ribbert, Verrooms Zeitschr. f. allgem. Physiol. 4, 1904.

[3]) Schlecht, Zieglers Beiträge 40, 1907.

[4]) Bouffard, Ann. d. l'institut Pasteur 20, 1906.

[5]) Goldmann, Bruns Beitr. z. klin. Chir. 1909, 1911, 1912.

[6]) Schulemann, Arch. mikr. Anat. 79, 1912.

[7]) Aschoff, cf. Suzuki, Kiyono.

[8]) Kiyono, Die vitale Carminspeicherung. Jena 1914.

[9]) v. Möllendorff, Anat. Hefte 53, 1915.

[10]) Suzuki, Zur Morphol. d. Nierensekretion. Jena 1912.

[11]) Kiyono, cf. Anm. 8 dieser Seite.

sichten wird noch zurückzukommen sein. Weitere Arbeiten liegen vor von Hoeber[1]), der hauptsächlich die Nierenfärbung berücksichtigte, und von Ruhland[2]), der mit pflanzlichem Material arbeitete. Schulemann[3]) untersuchte mit seinen Mitarbeitern die Theorie der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen. Etwa $3^1/_2$ Monate nach Veröffentlichung der Hauptresultate seiner Arbeiten im Rahmen einer vorläufigen Mitteilung[4]) erschien in gleicher Form eine diese Resultate bestätigende Arbeit von v. Möllendorff[5]), der 1915 die ausführliche Mitteilung[6]) seiner Ergebnisse folgte, zu denen er unabhängig von Schulemann auf völlig anderem Wege gekommen war.

Die Anschauungen, zu denen die einzelnen Forscher gekommen sind, sollen im Laufe der Arbeit an geeigneter Stelle näher gewürdigt werden.

2. Was ist „Vitalfärbung"?

Die ersten Vitalfärbungsversuche wurden — soweit mir die Literatur zugänglich ist — von Ehrlich mit Methylenblau an Nervenzellen ausgeführt. Von Ehrlich ist wohl auch das Wort Vitalfärbung geprägt worden. Es soll anzeigen, daß eine lebende Zelle durch einen Farbstoff gefärbt und hierdurch aus der Reihe anderer Zellen, die die Färbung nicht annehmen, hervorgehoben wird.

Später zeigte es sich, daß gerade die Methylenblaufärbung an Nervenzellen auch an überlebendem Material möglich ist, daß hier eine „Supravitalfärbung" vorliege. Andere Farbstoffe wurden dann aufgefunden, die wie Neutralrot teils Protoplasmabestandteile lebender Zellen (Drüsenzellen) teils überlebender (Leukocyten) spezifisch färbten; oft auch ist es unmöglich, zu sagen, ob eine spezifisch gefärbte Zelle lebend, ob absterbend oder tot sei. So erklärt sich wohl, daß in der Literatur teils

[1]) Hoeber, Arch. f. d. ges. Physiol. **108**, diese Zschr. **11**, 105; **20**, 56; **50**, 418. — Die physik. Chemie d. Zelle u. d. Gewebe III. Leipzig 1912.

[2]) Ruhland, Jahrb. wiss. Bot. **46**, 1; **51**, 376. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **30**, 139.

[3]) Schulemann, l. c.

[4]) Evans, Schulemann u. Wilborn, Deutsche med. Wochenschr. **1914**, Nr. 30.

[5]) v. Möllendorff, ibid **1914**, Nr. 41.

[6]) v. Möllendorff, l. c.

von Vitalfärbung, teils von Supravitalfärbung bei den gleichen Vorgängen gesprochen wird.

Ebenso unscharf ist die Definition der Vitalfärbung durch die Darstellung der gefärbten Zellen oder Zellteile. Einerseits können durch Vitalfärbungsmethoden zweifellos präformierte Zellbestandteile gefärbt werden, wie z. B. Neurofibrillen, Zellkerne, manche Arten von Protoplasmabestandteilen, andererseits ist man mitunter durchaus im Unklaren darüber, was die Vitalfärbung eigentlich darstellt. In diesem Falle handelt es sich meist um Protoplasmagranula, die nach anderen histologischen Methoden nicht darstellbar sind, von denen man nicht weiß, ob sie durch die Vitalfärbung künstlich erzeugt werden, ob es überhaupt gefärbte Protoplasmabestandteile oder Farbstoffeinlagerungen sind.

Will man sich mit der Theorie der Vitalfärbung beschäftigen, so ist es unbedingt notwendig, sich klar vor Augen zu halten, welcher Vielheit von Erscheinungen verschiedenster Art man gegenübersteht und wie unklar der Begriff der Vitalfärbung als solcher ist. Ganz besonders wird daran zu denken sein, daß ein Farbstoff im gleichen Tier in den verschiedenen Zellen durchaus verschiedene Wirkung haben kann. Ich erinnere z. B. an das Sulforhodamin, das sowohl Zellkerne wie „Protoplasmagranula" darstellen kann, an Methylenblau, das Neurofibrillen und „Granula" färbt[1]).

3. Wahl des Untersuchungsmaterials.

Es erscheint daher notwendig, sich bei der Wahl des Untersuchungsmaterials die größten Beschränkungen aufzuerlegen, nur nahe verwandte Farbstoffe zur Untersuchung zu verwenden und deren biologisches Verhalten nur bei identischen Zellarten zu vergleichen. Erst wenn auf diesem empirischen Wege gewisse Ergebnisse erzielt sind, werden allgemeinere Schlüsse berechtigt erscheinen.

Die ausgewählten Farbstoffe sind sämtlich Säurefarbstoffe (das Anion des Farbstoffsalzes ist farbig), zunächst wurden die

[1]) Wenn daher Kiyono (l. c. 16) die Kernfärbung der Nierenepithelien durch Indigcarmin gegen meine Theorie der Granulaentstehung ins Feld führt, so vergißt er eben, daß ein Farbstoff verschiedene Wirkungen haben kann (cf. auch später).

nächsten Verwandten des Trypanblaus, eines Disazofarbstoffes, später auch andere Säurefarbstoffe untersucht.

Die Gesichtspunkte, die zur Wahl dieses Farbstoffes führten, wurden bereits oben dargelegt, doch erscheint es mir notwendig, noch einmal darauf hinzuweisen, daß das erstrebte Ziel die Wahl des Farbstoffes bedingen muß. Es ist immer wieder von guten und schlechten Vitalfarbstoffen die Rede. Zweifellos ist für histologische Untersuchungen der Farbstoff der beste, der ungiftig ist und die schönsten und haltbarsten mikroskopischen Präparate liefert[1]). Für biologische Versuche aber wird man den wählen müssen, der die größte Zahl in möglichst reinem Zustande erhältliche Verwandte aufweist, und dessen Konstitution genau bekannt ist.

Zum Verständnis der Arbeit sei zunächst ganz kurz referiert, welches histologische Bild die Vitalfärbung mit Säurefarbstoffen wie Trypanblau, Carminsäure usw. liefert. Die einzelnen Farbstoffe zeigen in ihrem biologischen Verhalten nur geringe Abweichungen.

In der folgenden Darstellung kann ich mich den ausführlichen Darlegungen von Aschoff-Kiyono anschließen, da die Trypanblaufärbung die gleichen histologischen Tatsachen zeigt.

4. Das histologische Bild bei der Färbung mit sauren Vitalfarbstoffen.

Am weitesten ausgebreitet ist die Vitalfärbung der Zellen mesenchymatischen Ursprungs.

Von den Elementen des Bindegewebes zeigen die Fibro-

[1]) Kiyono (l. c., 212) verbreitet sich ausführlich darüber, wieviel besser die Carminsäurefärbung als die Trypanblaufärbung sei und meint, daß mit der neueren Färbung mit Trypanblau, Isaminblau usw. nicht mehr gewonnen wird, als mit der „altbewährten" Carminmethode. Er vergißt dabei aber, daß Goldmanns Versuche vor seinen Carminfärbungen viel neue Tatsachen ans Licht förderten, die mit Ribberts Methoden noch nicht erzielt worden waren. Auch erwähnt er nicht, daß gerade die ausgedehntere Anwendung der Vitalfärbung durch Goldmanns Arbeiten veranlaßt wurde. Sagt doch Aschoff im Vorwort zu Kiyonos Arbeit selbst, daß die Goldmannschen Versuche für ihn Veranlassung waren, auch das Material der carmingespeicherten Tiere für die Entzündungslehre besser als bisher zu verwerten. So tauchte nach Goldmann die Ribbertsche Methodik wieder auf.

blasten feinkörnige Farbstoffeinlagerungen. Diese sind besonders stark in den Klasmatocyten (Makrophagen), denen Aschoff den Namen Histiocyten beilegt. Die Fettzellen zeigen in ihrem Protoplasma nur geringe Farbstoffkörnchen. Wo im Körper Bindegewebe angetroffen wird, ist die Färbung die gleiche.

Die ebenfalls mesenchymatischen Endothelien der Blutgefäße zeigen meist nur geringe Farbstoffspeicherung. Diese Speicherung kann aber eine sehr bedeutende werden, wo besondere Funktionszustände der Endothelien vorliegen oder herbeigeführt werden. Hier sind die Endothelien der Lebercapillaren — besonders die Kupfferschen Sternzellen —, das Endothel von Knochenmark, Nebenniere, die Reticuloendothelien von Milz, Blutlymphdrüsen, Lymphdrüsen, Thymus und Knochenmark anzuführen. Aus den fixen vitalfärbbaren Endothelien entstehen — ganz besonders unter dem Einfluß pathologischer Prozesse — freie Histiocyten, die dann auch im strömenden Blut auftreten, im ganzen Körpergewebe wandern können und sich besonders an Orten ansiedeln, wo pathologische Vorgänge stattfinden. Aber auch normalerweise finden sich starke Ansammlungen solcher vitalfärbbarer Histiocyten in allen blutbildenden Organen und besonders im Netz. Geringere Farbstoffspeicherung zeigen die Deckzellen der serösen Gewebe (Pleura, Peritoneum usw.).

Alle übrigen Blut- und Bindegewebselemente, wie Erythrocyten, Leukocyten, Lymphocyten, Plasmazellen und Mastzellen bleiben frei von Vitalfärbung. Ebenso kommt es im normalen Nervensystem weder zur Färbung von Nerven- noch von Gliazellen. In den Rückenmarks- und Gehirnhäuten aber finden sich die farbstoffspeichernden Bindegewebszellen wieder. Nur in der Neurohypophyse begegnet man vitalfärbbaren Zellen, deren Natur noch nicht völlig geklärt ist.

Eine fast so intensive Vitalfärbung wie die Histiocyten weisen beim Kaninchen die Leberzellen auf, während bei der Maus die Leberzellen keine Farbstoffeinlagerungen zeigen.

Äußerst stark ist die Farbstoffablagerung in den Epithelien der Hauptstücke der Tubuli contorti der Nieren, während es im Innern der Tubuli häufig zur Bildung von Farbstoffcylindern kommt. Sehr gering ist die Farbstoffspeicherung in den Rindenepithelien der Nebenniere bei lange fortgesetzter Car-

minsäureinjektion, etwas stärker bei Anwendung von Trypanblau.

Hier zeigt sich — besonders bei Anwendung von Trypanblau[1]) — ein fundamentaler Unterschied zwischen der Vitalfärbung der Bindegewebs-, Leber- und Nierenzellen und den Rindenzellen. Während in den bisher genannten Zellarten die Farbstoffeinlagerungen von äußerst intensiver Färbung sind, einen meist klumpigen, oft auch eckigen Eindruck machen, liegen neben wenigen solcher intensiv gefärbten Einschlüssen feine runde, bei Trypanblau nur leicht hellblau gefärbte, bläschenartige Granula.

Dieser Unterschied tritt noch weit schärfer zutage in den Epithelzellen des Vorderlappens der Hypophyse und der Epithelkörperchen, in denen durch Trypanblau schwach hellblaue, runde Bläschen dargestellt werden, die scharf gegen die tiefschwarzblauen Klumpen in den Histiocyten und Fibroblasten in genannten Organen kontrastieren (cf. Schulemann, Arch. f. mikr. Anat. 79, 1912, Abbild. 11). Durch die Carminmethode sind diese Granula nicht darstellbar.

Einen ähnlichen Unterschied weisen die Granula in den Epithelzellen des Plexus chorioideus auf. Sie sind von gleichmäßiger, runder Gestalt und zeigen einen weit helleren Farbton, als die Granula der im Bindegewebe des Plexus gefärbten Fibroblasten und Histiocyten. Auch durch Carminsäure werden diese Plexusgranula dargestellt.

Schon in ihrem Äußeren steht daher die Vitalfärbung von Nebennierenrindenzellen, Hypophyse, Epithelkörper, Plexus chorioideus in einem Gegensatz zur Färbung der anderen Zellen, der durch das teilweise verschiedene Verhalten dieser Zellen gegen Carminsäure einerseits, Trypanblau andererseits noch schärfer hervorgehoben wird.

Ein weiterer Unterschied zwischen Carminsäure- und Trypanblaufärbung besteht im Verhalten des elastischen Gewebes.

---

[1]) Groß, Steckelmacher, Kiyono (besonders Kiyono) stellen Trypanblau und Tolidinblau einander gegenüber. Es sei erwähnt, daß identisch sind: Trypanblau = Tolidinblau = Diaminblau 3B = Bleu Diamine 3B = Benzoblau 3B = Kongoblau 3B = Dianilblau H3G = Naphthaminblau 3BX = Benzaminblau 3B = Azidinblau 3B = Niagarablau 3B (cf. Schultz V, 391).

Carminsäure läßt dieses ungefärbt, Trypanblau färbt es in gleichmäßig hellblauem Tone an.

Alle weiteren Zellen bleiben frei von Farbstoffen, besonders alle epithelialen Elemente.

Hervorgehoben sei nur noch, daß die Supravitalfärbung mit Isaminblau die eosinophilen Granula in den Leukocyten und Myelocyten bei Rana esculenta darstellt, während die Bindegewebszellen supravital keine Färbung aufweisen[1]). Weitere Versuche in dieser Richtung habe ich nicht unternommen.

Bezüglich der histologischen Einzelheiten sei auf die zusammenfassenden, bereits zitierten Arbeiten verwiesen.

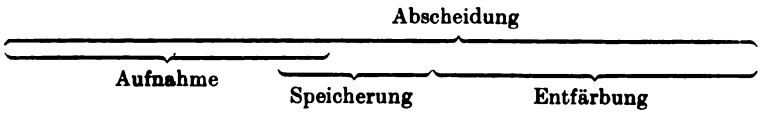
Anschließend an dieses Normalbild, wie es bei Anwendung eines „histologisch guten" Vitalfarbstoffes, z. B. Trypanblau, entsteht, will ich im folgenden die Variationen des histologischen Bildes schildern, wie sie bei anderen Säurefarbstoffen der gleichen Klasse entstehen. Hierbei kann ich die Farbstoffe in einzelne Gruppen nach ihrem biologischen Verhalten zusammenfassen, obwohl die Einteilung von einer großen Willkür sein muß, da zwischen allen Gruppen fließende Übergänge bestehen.

5. Färbungsintervall bei Trypanblau.

Nach der einmaligen Injektion von Trypanblaulösung in die Bauchhöhle einer weißen Maus diffundiert der Farbstoff rasch in die Körpergewebe und wird durch Blut und Lymphe, in denen er gelöst zirkuliert, rasch nach allen Organen transportiert. Frühzeitig beginnt bereits die Abscheidung des Farbstoffes durch Niere und Leber. Äußerlich zeigt das Tier eine zunehmend intensivere Allgemeinfärbung, aber selbst bei Beginn der Maximalfärbung ist eine Farbstoffspeicherung in den vitalfärbbaren Zellen noch nicht allgemein nachweisbar. Die Speicherung wird erst reichlich, wenn das Maximum an Farbstoffkonzentration in den Organen erreicht ist und einige Zeit bestanden hat. Die Abscheidung mit Urin und Galle ist zunächst eine rasche, solange noch gelöster Farbstoff in den Gewebssäften vorhanden ist. Dann geht sie immer langsamer

[1]) Analoge Beobachtungen machte später bei Tolidinblau auch Kiyono, Fol. haemat. 18, 164, 1914. — Vgl. Schulemann, Arch. f. mikr. Anat. 79, 230, 1912.

vonstatten. In dieser Phase der langsamen Abscheidung findet eine Verminderung der Menge des in den Zellen gespeicherten Farbstoffes statt, bis der gesamte injizierte Farbstoff wieder abgeschieden — das Tier frei von Farbstoffgranulis ist. Das Zeitverhältnis von Aufnahme-, Speicherungs-, Abscheidungs- und Entfärbungsphase stellt annähernd folgendes Schema dar:



6. Vitalfärbung mit anderen Säurefarbstoffen.

a) Mit kürzerem Färbungsintervall als Trypanblau.

Es existiert nun eine ganze Reihe von Farbstoffen, bei denen die Resorption der Farbstofflösung aus der Bauchhöhle erheblich rascher vor sich geht als beim Trypanblau. Das Maximum der Allgemeinfärbung wird schneller erreicht, die Abscheidung erfolgt gleichfalls in einem kürzeren Zeitintervall. Die Speicherung von solchen Farbstoffen in den vitalfärbbaren Organzellen ist immer noch eine ausgiebige, doch verschwinden die „Granula“ während der Ausscheidungsphase in erheblich kürzerer Zeit. Der ganze, beim Trypanblau in Wochen ablaufende Vorgang von Aufnahme, Speicherung, Abscheidung, Entfärbung, verläuft bei solchen Farbstoffen im Verlauf von Tagen.

Das Aussehen der „Farbstoffgranula“ in den Zellen unterscheidet sich nicht wesentlich von den „Trypanblaugranulis“. Mitunter freilich — namentlich bei solchen Farbstoffen, bei denen der Färbungsvorgang sehr rasch abläuft — gewinnt man den Eindruck, als sähen die Farbstoffgranula größer, eckiger und weniger kompakt aus, als bei der Trypanblaufärbung.

Bei einer weiteren Reihe von Farbstoffen läuft der Färbungs-Entfärbungsvorgang in noch kürzerem Zeitintervall — in 24 Stunden, ja weniger als 24 Stunden — ab. Speicherung, d. h. Granulabildung in den Zellen, ist nur sehr kurze Zeit zu beobachten und tritt nur da ein, wo der Farbstoff längere Zeit in verhältnismäßig hoher Konzentration in den Organen sich befindet. Orte maximaler Konzentration sind der Injektionsort und die Orte der Abscheidung, d. h. Leber und Niere. Bei

intraperitonealer Injektion kommt es demnach in den im freien Exsudat und im Netz vorhandenen Histiocyten zur Granulabildung. In der Niere finden sich in den Lumina der Harnröhrchen zunächst nur Farbstoffcylinder, dann sind auch einige Granula in den Epithelien der Hauptstücke zu sehen. Ähnlich tritt in der Leber, namentlich in der Gallenblase Bildung von Farbstoffniederschlägen ein. In den Kupfferschen Sternzellen finden sich einige Farbstoffgranula. Diese „Granula" — namentlich in den Histiocyten — zeigen hier meist den Charakter von Vakuolen, in denen mehr oder weniger reichlich feste Farbstoffkörnchen in lebhafter Brownscher Molekularbewegung tanzen. Neigt der Farbstoff zur Krystallbildung, so kann es auch in den Vakuolen zur Entstehung von Krystallen kommen (cf. später Sulforhodamin). In den übrigen Organzellen sind „Granula" überhaupt nicht wahrzunehmen.

Endlich gibt es Farbstoffe, die bereits in weniger als 1 Stunde die Tiere maximal färben. Einige Stunden später ist völlige Entfärbung wieder eingetreten. Speicherung in den Zellen, auch Vakuolenbildung ist überhaupt nie zu beobachten.

Wie ich bereits betonte, ist die Einteilung eine durchaus willkürliche, denn von dem gut vitalfärbenden Trypanblau leitet eine ununterbrochene Reihe von Farbstoffen von Klasse zu Klasse hinüber bis zu den zuletzt genannten Farbstoffen, die rasch den Körper durcheilen und sich gar nicht mehr ablagern.

b) Mit längerem Färbungsintervall als Trypanblau.

Wieder ausgehend vom Trypanblau, will ich nun den zweiten Weg gehen, der uns herabführt zu den Farbstoffen, die am Injektionsort liegen bleiben und keine allgemeine Vitalfärbung geben. Auch hier will ich von Farbstoffklasse zu Klasse gehen, obwohl überall fließende Übergänge existieren.

Abwärts gelangen wir zunächst zu Farbstoffen, die erst nach Tagen zu einer maximalen Allgemeinfärbung der Tiere führen. Obwohl die Abscheidung zeitig einsetzen kann, dauert sie doch außerordentlich viel länger als beim Trypanblau. Die Speicherung bleibt lange bestehen. Am Injektionsort sind die Granula mehr oder weniger grob und zahlreicher, als in anderen entfernteren Körperregionen. In diesen entfernteren Körper-

teilen sind die Granula zunächst spärlicher, und jedes einzelne Granulum ist kleiner und regelmäßiger.

Andere Farbstoffe erzeugen zunächst nur „Granula" am Injektionsorte und seiner näheren Umgebung, bei intraperitonealer Injektion besonders am Netz, dann in den Organen der Bauchhöhle — besonders der Leber —, in den regionären Lymphdrüsen und der Innenseite der Bauchwand. Äußerlich ist zunächst gar keine Färbung zu sehen. Erst mehrmals wiederholte Injektionen führen zur Allgemeinfärbung. Diese beginnt zunächst am Bauch und schreitet von hier langsam nach Kopf und Schwanz hin fort. Intensiv aber wird diese Allgemeinfärbung nie. Die Granula sind am Injektionsort und seiner Umgebung äußerst zahlreich und intensiv gefärbt. Je weiter wir uns vom Injektionsort entfernen, desto schwächer ist die Farbstoffspeicherung. Noch langsamer als die Speicherung geht die Entfärbung vor sich. Nach vielen Monaten sind die injizierten Farbstoffe noch in den Organen nachweisbar.

Endlich schließen sich hieran solche Farbstoffe, die auch bei vielmaliger Injektion zu keiner Allgemeinfärbung führen. Bei einigen ist äußerlich noch eine Färbung der Bauchdecken zu sehen, bei anderen tritt auch diese nicht mehr ein. Die gesamte injizierte Farbstoffmenge wird gespeichert in den lokal vorhandenen vitalfärbbaren Zellen, besonders den Histiocyten. Speicherung in Zellen anderer Organe tritt nur ein, wo der Farbstoff direkt hingelangt, z. B. auf dem Wege der Lymphbahnen in die regionären Lymphdrüsen; so heben sich die retrosternalen Lymphbahnen und die am Ösophagus aufsteigenden sowie die in sie eingeschalteten Lymphdrüsen, wie die tiefen Halslymphdrüsen, scharf aus dem umliegenden ungefärbten Gewebe ab. Daß so ungeheure Farbstoffmengen lokal gespeichert werden können, ist dadurch möglich, daß Histiocyten in ganz enormer Zahl neugebildet werden. Diese Vermehrung ist eine so außerordentliche, daß z. B. das Netz zu einem dicken gallertigen Klumpen anschwillt, der aus vitalgefärbten Histiocyten im wesentlichen besteht.

c) Kolloide Metallösungen und Farbstoffsuspensionen.

Zwanglos schließen sich in ihrem biologischen Verhalten dieser Gruppe nur streng lokal vitalfärbender Farbstoffe die

kolloiden Lösungen von Metallen wie Silber, Gold, Platin, Palladium an.

Ebenso zeigen Farbstoffe, die in Wasser gar nicht löslich sind, ihrer Konstitution nach aber auch zu den Säurefarbstoffen gehören, das gleiche biologische Verhalten, wenn sie in feiner, wäßriger Suspension intraperitoneal eingespritzt werden. Die einzelnen Farbstoffpartikelchen werden langsam von den Zellen aufgenommen, die sonst mit sauren Vitalfarbstoffen färbbar sind. Die Form der „Granula" entspricht dann natürlich genau der eines in der Suspension befindlichen Farbstoffkörnchens.

Auch diese Reihe von Farbstoffen vom Trypanblau bis zu den Farbsäuresuspensionen ist eine durchaus kontinuierliche. Dies geht besonders deutlich daraus hervor, daß wir ein und denselben Farbstoff in verschiedenen dieser „Klassen" wiederfinden können, je nach dem Lösungszustand, in dem er injiziert wurde. Einige Beispiele mögen dies erläutern.

7. Vitalfärbung mit:

a) Lithiumcarmin und freier Carminsäure.

Das von Ribbert zuerst zur Vitalfärbung verwendete Lithiumsalz der Carminsäure ist in wäßriger Lösung ein Farbstoff, der biologisch dem Trypanblau sehr nahe steht. Das Lithiumcarmin färbt langsamer, doch bleibt die Färbung länger bestehen. Freie Carminsäure ist in Wasser nicht löslich. In feiner wäßriger Suspension intraperitoneal injiziert, wird sie von den Zellen aufgenommen, die mit Trypanblau oder Lithiumcarmin vitalfärbbar sind. Die mit Carminsäure-Suspension erhaltene Vitalfärbung aber bleibt streng lokal und tritt nur noch in den regionären Lymphdrüsen der Bauchhöhle auf.

b) Salzhaltigen und salzarmen Farbstoffen.

Ähnliche, wenn auch nicht so scharfe Unterschiede zeigen Farbstoffe wie Benzopurpurin B und Toluylenrot R T. So färbt z. B. Benzopurpurin B als salzhaltiger Handelsfarbstoff langsamer allgemein vital, als ein durch Reinigung salzarmes Benzopurpurin.

c) Mit warm und kalt bereiteten Farbstofflösungen.

Dieselben Unterschiede zeigen langsam färbende, warm bereitete Lösungen von Benzopurpurin oder Toluylenrot gegen-

über gleichstarken, aber kalt bereiteten, schneller allgemein färbenden Lösungen derselben Farbstoffe. Noch weiter verzögert wird der Eintritt der Allgemeinfärbung, wenn die Lösung gealtert und zum Gel erstarrt ist. Nach Injektion eines solchen Geles tritt die Allgemeinfärbung sehr spät ein.

d) Mit konzentrierten und verdünnten Farbstofflösungen.

Einer scheinbar sehr merkwürdigen Tatsache begegnen wir bei den Farbstoffen Nr. 153 und 154. Nach Injektion von 10 ccm der 1%igen Lösung intraperitoneal beim Meerschweinchen trat zunächst keine Resorption und allgemeine Färbung der Tiere ein. Nach 24 Stunden fand sich noch die gesamte eingespritzte Farbstofflösung frei in der Bauchhöhle. Wurde hingegen einer weißen Maus 1 ccm einer 0,5%igen Lösung der gleichen Farbstoffe intraperitoneal injiziert, so gelang es, durch einige Injektionen eine allgemeine, wenn auch schwache, Vitalfärbung zu erzielen.

8. Einfluß der Injektionsart auf die Vitalfärbung.

Von größtem Einfluß ist fernerhin der Injektionsmodus. Je nach dem, ob intraperitoneale, intravenöse, subcutane oder intramuskuläre Injektion angewendet wird, können die Endresultate bei ein und derselben Farbstofflösung verschiedene sein.

a) Bei Lösungen von Säurefarbstoffen.

So entsteht beispielsweise durch intravenöse Injektion von Benzopurpurin oder Toluylenrot, wenn eine konzentriertere oder warm bereitete oder alte Farbstofflösung verwendet wird, sofort eine tödliche Embolie. Die gleichen Lösungen liefern intraperitoneal eine langsam entstehende, allgemeine Vitalfärbung. Subcutane Injektionen führen bei diesen Farbstoffen viel langsamer zur Allgemeinfärbung, wenn es überhaupt dazu kommt. Häufig kommt es bei der starken lokalen Reizung zur Absceßbildung, die weitere Injektionen verhindert oder zum Tod der Tiere führt. Fast ebenso wirkt intramuskuläre Injektion. Aus den vielen möglichen Beispielen sei noch auf das Isaminblau 6 B verwiesen (cf. die Protokolle 24 a und b): intravenös—Embolie, intraperitoneal oder subcutan—allgemeine Vitalfärbung.

b) Bei kolloiden Metallösungen.

Auch die Metallkolloide zeigen je nach der Injektionsart einen verschiedenen Verbreitungsbereich, und Kiyono hat von der Lösung chinesischer Tusche (kolloider Kohlenstoff mit Gelatine als Schutzkolloid) das gleiche gezeigt. Über den Befund bei intraperitonealer Injektion von Palladiumhydrosol cf. Protokoll Nr. 1015. Bei intravenöser Injektion bleibt die im vorigen Versuch so intensiv vital gefärbte Bauchhöhle frei von Palladium. Jetzt aber sind die im vorigen Versuch fast frei von Palladium gebliebenen vitalfärbbaren Endothelien in Milz, Blutlymphdrüsen, Knochenmark, Nebenniere, Leber, aufs intensivste beladen mit tiefschwarzen Granulis. Alle sonst vitalfärbbaren Zellen im Körper, die nicht in direktem Kontakt mit der Blutbahn stehen, bleiben palladiumfrei. Dies gilt aber nur für einmalige intravenöse Injektion und Untersuchung etwa 24 Stunden nach der Injektion. Wird die Untersuchung später vorgenommen, oder etwa nach mehreren Injektionen im Abstand von einigen Tagen, so finden wir das Palladium auch in anderen Zellen, als nur den Endothelien, sei es, daß die Endothelien mobil werden und wandern, sei es, daß sie die Palladiumgranula weitergeben. Subcutane Injektion führt nur zur streng lokalen Vitalfärbung der Histiocyten des subcutanen Bindegewebes, intramuskuläre zur Histiocytenfärbung in den Muskelinterstitien. Stets wird das Palladium — wie auch Gold, Silber, Platin usw. — von den sonst durch Trypanblau vitalfärbbaren Zellelementen in Granulaform aufgenommen.

Vermittelnd zwischen den nur lokal vitalfärbenden löslichen Farbstoffen und den Farbstoffsuspensionen stehen wieder solche Farbstoffe, die mit Wasser nur eine trübe Lösung (mit stärkstem Tyndall-Phänomen) geben, wie z. B. das Lachsrot (Sch. J. IV, Nr. 208). Die trübe Lösung bleibt auch beim Filtrieren durch angefeuchtetes Filtrierpapier unverändert und verhält sich bei intraperitonealer Injektion wie eine Aufschwemmung einer Farbstoffsäure.

Nr. 1015. Kolloidales Palladium. (Kalle & Co.)

Maus. 0,2%ige, wäßrige Lösung intraperitoneal je 1 ccm.

Erste Maus: 7., 10., 13., 16., 20., 24., 27., 30. XII. 12; 2., 6., 10. I. 13.

Die Maus blieb stets ungefärbt und wurde am 13. I. getötet und als makroskopisches Präparat aufbewahrt.

Zweite Maus: Je 1 ccm den 7. XII., 10., 13., 16. XII. Das gesunde, ungefärbte Tier wird am 20. XII. getötet und sofort untersucht.

Die Bauchwand ist äußerlich tiefschwarz gefärbt, sonst ist das Tier ungefärbt.

Sektion: Bauchhaut und Subcutis tiefschwarz. Bauchmuskulatur: grau. Die Injektionsstellen sind dickere schwarze Flecken. Die Subcutis ist erfüllt von ungeheuren Massen vital gefärbter Wanderzellen, deren Protoplasma dicht erfüllt ist von vielen tiefschwarzen Granulis. Ebenso sind in der Muskulatur der Bauchwand alle vital färbbaren Zellen prachtvoll schwarz granuliert. Ebenso die den Muskelfasern anliegenden länglichen Bindegewebszellen. Die Injektionsstellen sind ein Konglomerat von tiefschwarz vital gefärbten Wanderzellen.

Die freien Makrophagen in der Bauchhöhle sind erfüllt von tiefschwarzen Granulis, die hier gröber erscheinen als die Granula in den Zellen der Muskulatur und der Subcutis der Bauchhaut. In den freien Makrophagen scheinen die Granula mitunter in Vakuolen zu liegen. Jedenfalls finden sich dieselben oft in kreisförmiger Anordnung im Protoplasma. Diese Anordnung steht jedoch in keiner Beziehung zu den Zellkernen. Das Netz ist tiefschwarz und enthält Massen vital gefärbter Makrophagen. Die tâches laiteuses heben sich durch vitale Färbung scharf hervor. Die Bauchhöhle ist im allgemeinen rein. Schwarze Flecken finden sich auf einer Darmschlinge, auf dem Tubenfett, auf Mesenterium und Leber.

Pankreas: +++ enthält vital gefärbte Makrophagen und Bindegewebszellen, letztere nur mit wenigen schwarzen Granulis.

Die Oberfläche der Leber ist bedeckt von tiefschwarz gefärbten Makrophagen. Die Kupfferschen Sternzellen weisen intensivste Färbung auf durch meist feine schwarze Granulis. Die Leberzellen sind frei von Palladium.

Die Oberfläche der Milz ist bedeckt von tiefschwarz gefärbten Makrophagen. In der Pulpa finden sich schwarz granulierte Zellen.

Niere und Ovarium: vollständig negativ.

Nebenniere: +.

Alle Körperlymphdrüsen sind tiefschwarz, besonders schön alle thorakalen Lymphdrüsen. Sie enthalten sämtlich tiefschwarz vital gefärbte Makrophagen.

Thorax-Lymphdrüsen voll tiefschwarz gefärbter Makrophagen mit groben Granulis. Daneben vielleicht auch freie Palladiumteilchen.

Herzmuskulatur: negativ.

Lunge: einige schwarz granulierte Zellen.

Subcutis am Kopf und Muskulatur am Hals: negativ.

Nr. 1015a. Kolloidales Palladium.

Kaninchen. 0,2%ige Lösung.

29. X. 12: 20 ccm intravenös.

6. XI. 12: 20 ccm intravenös.

15. XI. 12: 20 ccm intravenös, 5 ccm subcutan am Rücken.

25. XI. 12: getötet.

Das Tier zeigt äußerlich keine Färbung, auch nicht an der Conjunctiva.

Frische Untersuchung von Quetschpräparaten.

Leber: Kupffersche Sternzellen +++++++++ enthalten tiefschwarze Granula.

Niere: vollständig negativ.

Kochenmark: viele Zellen ++++++.

Nebenniere: einige verstreute Granula in Zellen des Markes.

Blutlymphdrüse vom Hals: +++++++++.

Herz, Wand des rechten Ventrikels: W.-Z. +++.

Thorakale Lymphdrüsen: ++++++.

Milz und akzessorische Milz: ++++++.

Muskulatur am linken Bein: keine W.-Z. gefärbt.

Stelle der intramuskulären Injektion am Rücken:

Freie schwarze Granula: alle W.-Z. von schwarzen Granulis beladen.

Schnittpräparate von Leber, Niere, Milz, Herz, Nebenniere, normalem Muskel und intramuskulär injiziertem Muskel ergaben die gleichen Befunde.

Nr. 1015b. Kolloidales Palladium (Kalle & Co.).

Kaninchen. 0,2%ige wäßrige Lösung 20 ccm: intravenös den 7. XII. und 13. XII., den 19. XII. 12 einem Kaninchen.

Blutausstriche, jeweils vor der Injektion angefertigt, am 7. XII., 9. XII., 10. XII., 11. XII., 12. XII., 14. XII., 15. XII., 16. XII., 17. XII., 18. XII., 19. XII. 12. Es hat sich keine auffällige Änderung des Blutbildes gezeigt.

Am 13. XII. 5 Uhr p. m.: Darmtemperatur + 39,6° sofort nach der intravenösen Injektion um 5^{15} p. m. + 39,6°.

Am 19. XII.: Temperatur vor Injektion 10^{25} a. m. + 39,15°, 10^{30} Injektion beendet. 10^{35} + 38,85°. 10^{40} + 38,65°. Um 10^{40} stirbt das Kaninchen unter den typischen Erscheinungen einer Embolie, Embolus in der Arteria basilaris cerebri.

10%ige Formollösung vom Herzen aus injiziert.

Makroskopischer Befund: Leber, Knochenmark, Milz: tiefschwarzrot. Lymphdrüsen am Hals rauchgrau.

Sonst in der Färbung von einem normalen Tier nicht zu unterscheiden.

Mikroskopische Untersuchung: Paraffinschnitte mit Alauncarmin gegengefärbt.

Leber: Die Kupfferschen Sternzellen sind mit schwarzen Granulis beladen. Die Leberzellen enthalten solche nicht.

Epithelkörperchen: Epithelzellen enthalten kein Palladium, dagegen finden sich im Bindegewebe einige Zellen, die schwarze Granula enthalten. Ob es Capillarendothelien sind, ist nicht zu unterscheiden.

Niere: vollständig frei von Palladium.

Knochenmark: Capillarendothelien (der Venen) stark beladen mit Palladiumgranulis. Ob auch Zellen, die nicht Endothelien sind, Palladium enthalten, ist nicht sicher zu entscheiden. (Die Färbung entspricht im wesentlichen der Knochenmarksfärbung mit Trypanblau [?].)

Ovarium und Tube: Frei von Palladium.

Eine Lymphdrüse vom Hals enthält viel pigmentierte Zellen, aber kein Palladium.

Herz: keine Palladiumfärbung.

Nebenniere: Rinde frei von Palladium.

Dagegen findet sich Palladium im Mark, und zum Teil ist scharf zu erkennen, daß die Palladiumgranula in Capillarendothelien liegen.

9. Die Reaktion des tierischen Organismus auf die Vitalfärbung.

Bemerkenswert erscheint ferner, daß auch die Reaktion des Organismus auf die Injektion solcher Farbstofflösungen Abhängigkeit von dem im vorhergehenden geschilderten Verhalten der Farbstoffreihen zeigt. Es ist für das lebende Tier keineswegs gleichgültig, ob es vitalgefärbt ist oder nicht, so gering auch scheinbar der Einfluß der Vitalfärbung auf das Wohlbefinden der Tiere ist.

a) Bei histologisch guten Vitalfarbstoffen.

Lithiumcarmin.

Kiyono deutet bereits darauf hin, daß wohl erst durch die Carmininjektion freie Histiocyten in das strömende Blut des großen Kreislaufes gelangen. Er glaubt, daß mehrfache Injektionen — eine „chronische" Vitalfärbung — die Mutterzellen der Histiocyten zur Bildung neuer Histiocyten anregt. Er hat beobachtet, wie z. B. die Sternzellen, wenn sie stark mit Carmin beladen worden sind, hypertrophieren, mit ihrem Leib Capillaren verlegen, daß riesenzellartige Gebilde aus ihnen entstehen und auch Zellteilung einsetzt. Auch weist Kiyono darauf hin, daß durch die Carminfärbung Histiocyten in den Kreislauf gelangen, die Lungencapillaren geradezu verstopfen können, was normalerweise nicht stattfindet.

Für das Lithiumcarmin kann ich Kiyonos Beobachtungen in dieser Richtung voll und ganz bestätigen und durch die Versuche mit anderen Farbstoffen erweitern.

Trypanblau.

1912 hatte ich für Trypanblau schon angedeutet, daß es anregend auf die Vermehrung der vitalfärbbaren Zellen wirkt, daß erst unter seinem Einfluß vitalfärbbare Zellen im freien Blutstrom auftreten. Weitere Versuche haben meine damalige Ansicht bestätigt.

b) Bei Farbstoffen mit kurzem Färbungsintervall.

Wenn wir wieder das Trypanblau als Ausgangspunkt wählen, so sehen wir, daß auf dem Wege, auf dem wir zu den Farbstoffen gelangen, die den Körper nur rasch durcheilen und nicht abgelagert werden, die Anregung zur Neubildung von Histiocyten eine immer geringere wird, um schließlich ganz zu erlöschen.

c) Bei Farbstoffen mit langem Färbungsintervall.

Umgekehrt wird die Reizung zur Neubildung histiocytärer Zellen eine um so intensivere, je mehr der Farbstoff zur Ablagerung in den Zellen neigt.

Lithiumcarmin führt schneller und in geringeren Dosen zur Histiocytenvermehrung als Trypanblau. Diaminschwarz BH und andere, noch langsamer allgemein färbende Disazofarbstoffe regen die Histiocytenneubildung ähnlich oder noch stärker als Lithiumcarmin an. Sehr ausgesprochen wird die Neubildung von Histiocyten bei Anwendung solcher Farbstoffe, die nur in der näheren Umgebung des Injektionsortes und an diesem selbst vitalfärben. Ich habe bereits oben darauf hingewiesen, daß das Netz zu einem dicken gallertigen Klumpen anschwellen kann, der im wesentlichen aus vitalgefärbten Histiocyten besteht. Ungeheure Massen solcher gefärbten Histiocyten finden sich im freien Exsudat, das hier oft schleimige Konsistenz zeigt, und in gallertigen Klumpen und Flecken, die der Bauchwand und der Oberfläche der Bauchorgane aufliegen. Das Optimum dieser Anregung zur Neubildung von Histiocyten zeigen wohl die kolloiden Metalle.

d) Der Einfluß der Injektionsart auf die Zellreaktion.

Auch diese Reizung zur Histiocytenbildung steht in gewisser Parallele zur Injektionsart. Während bei Trypanblau, Lithiumcarmin und anderen allgemein vitalfärbenden Vital-

farbstoffen alle Zellen, die zur Histiocytenbildung befähigt sind, neue Histiocyten produzieren, geschieht dies bei den mehr oder weniger lokal vitalfärbenden Substanzen im wesentlichen nur bei den Zellen, die mit der injizierten Lösung in direkte Berührung kommen und Speicherung zeigen. Die Lokalreaktion im Bauchraum habe ich bereits geschildert. Bei intravenöser Injektion ist die „Lokalreaktion" eine solche der Endothelien der Blutgefäße und blutbildenden Organe. Subcutane Injektion führt zur Neubildung der Histiocyten aus den am Orte vorhandenen Zellen, die Histiocyten bilden können. Ebenso gestaltet sich die Lokalreaktion bei intramuskulärer Reaktion.

Wir sehen also auch hier wieder eine weitgehende Parallelität zwischen dem Zeitintervall, während dem der Farbstoff im Körper weilt, und der Zellreaktion des Organismus, die uns auch beim Vorgang der Farbstoffspeicherung entgegentrat.

10. Färbungsintervall und gefärbte Zellart.

Endlich sei noch darauf hingewiesen, daß das Verbreitungsbereich der Vitalfärbung wächst mit der zunehmenden Geschwindigkeit, mit der ein Farbstoff den tierischen Organismus passiert. Wir lernten Farbstoffe kennen, die streng lokale, andere, die auch in der näheren Umgebung des Injektionsortes Vitalfärbung gaben. Lithiumcarmin färbt allgemein schön vital und ist dem Trypanblau sehr ähnlich. Das Verbreitungsbereich des Trypanblaus ist aber noch größer, denn es stellt auch Zellgebilde dar, wie im Epithelkörper, der Hypophyse und anderen Organen, die Lithiumcarmin nicht hervorhebt. Eine Reihe von Farbstoffen, die schneller als Trypanblau durch den Körper eilt, zeigt neben der Farbstoffspeicherung in den auch vom Lithiumcarmin hervorgehobenen Zellen Färbungen in solchen Organzellen, die weder vom Lithiumcarmin noch vom Trypanblau dargestellt werden. Wieder andere Farbstoffe, die kaum noch Speicherung in den bekannten Trypanblauzellen geben, vermögen sich noch weiter zu verbreiten.

Besonders betont sei immer wieder, daß bei der sehr großen Zahl der von mir und meinen Mitarbeitern untersuchten Farbstoffe ein durchaus kontinuierlicher Übergang im biologischen Verhalten von Farbstoff zu Farbstoff festzustellen war.

V. Physiko-chemische und biologische Eigenschaften der Säurefarbstoffe.

Die hier geschilderten biologischen Eigenschaften der Farbstoffe lassen eine Beziehung zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen nicht erkennen. Kapitel III 2b gab ich bereits eine Zusammenstellung einer Reihe von Farbstoffen, die beweist, daß ein direkter Zusammenhang zwischen chemischer Konstitution (Chemoceptoren!) und Vitalfärbungsvermögen nicht besteht. Noch weniger vermag eine rein auf chemischer Grundlage aufgebaute Theorie zu erklären, weshalb gleiche Farbstoffe in verschiedenem Lösungszustande sich biologisch verschieden verhalten, weshalb der Injektionsmodus von Einfluß auf die Verbreitung der Vitalfärbung ist. Hinfällig muß auch der mögliche Einwand sein, daß ein bestimmter Lösungszustand der Farbstoffe nötig sei, um den Chemoceptoren die Möglichkeit zu geben, zu den Zellen zu gelangen, wo sie mit passenden Receptoren reagieren können. Beweisend hierfür ist, daß sich auch in den einzelnen Reihen biologisch gleichwertiger Farbstoffe alle möglichen heterogenen „Chemoceptoren" finden.

1. Physiko-chemische Untersuchungsmethodik.

Im Kapitel III 2c wies ich bereits darauf hin, daß physikalische Eigenschaften der Farbstofflösungen wohl maßgebend für ihr biologisches Verhalten seien. Es war also notwendig, in derselben vergleichenden Weise, wie sie bei der biologischen Untersuchung der Farbstoffe angewendet wurde, das physikalische Verhalten zu untersuchen.

a) Osmotischer Druck.

Die Bestimmung des osmotischen Druckes ist nicht ausführbar. Fast alle untersuchten Farbstoffe sind Handelsprodukte, die neben Verunreinigungen mit sehr geringen Mengen organischer Körper stets mehr oder weniger große Mengen an Elektrolyten (Kochsalz, Natriumsulfat, Natriumcarbonat u. a. m.) enthalten. Wenn wir uns vergegenwärtigen, daß mancher Farbstoff bis zu 46 % solcher Salze enthielt, so zeigt das, daß von einer Messung des osmotischen Druckes gar keine vergleichbaren Resultate zu erwarten waren. Eine Reinigung der Farb-

stoffe ist nicht nur meist unmöglich, sondern für den vorliegenden Zweck auch unerwünscht,

Hunderte von Farbstoffen zu reinigen hätte jahrelange Arbeit erfordert, ohne zum Ziel zu führen. Selbst durch Dialyse ist dies nicht möglich, da stets kleine Elektrolytmengen zähe von den Farbstoffmolekülen festgehalten werden. Die Dialyse aber führt dabei noch zu weitgehender Änderung des Lösungszustandes der Farbstoffe. Hier aber interessiert auch nicht die Feststellung von Konstanten der reinen Farbstoffe, sondern von Vergleichswerten der bereits im Tierversuch verwendeten Handelsfarbstoffe.

b) Siedepunktserhöhung und Gefrierpunktserniedrigung.

Für die Bestimmung der Siedepunktserhöhung bzw. Gefrierpunktserniedrigung gelten diese Einwände ebenso wie für die Leitfähigkeitsmessung in noch weit höherem Maße. Hinzu kommt noch, daß bei allen 4 Methoden die erhaltenen Werte für reine Farbstoffe meist nur geringe Verschiedenheiten gezeigt hätten.

c) Oberflächenspannung.

Die stalagmometrische Messung der Oberflächenspannung mit dem J. Traubeschen[1]) Apparat hätte zwar für die Lösung der Handelsfarbstoffe genaue Werte ergeben, erscheint aber hier unzweckmäßig, da die Elektrolyte von größerem Einfluß auf diese physikalisch-chemische Messung gewesen wären, als er uns im Tierversuch entgegentritt, wo infolge der sehr viel rascheren Resorption der Elektrolyte als der Farbstoffe der Elektrolyteinfluß bald abgeschwächt wird.

d) Capillarer Aufstieg.

Gegen die Messung des capillaren Aufstieges in Stoff- oder Papierstreifen nach der Methode von Goppelsröder[2]) erheben sich hier die gleichen Einwände, die der Brauchbarkeit dieser Methode auch sonst entgegenstehen[3]).

---

[1]) J. Traube, diese Zeitschr. 42, 500, 1912.

[2]) Goppelsröder, Koll.-Zeitschr. 4, 5, 6, 1909/10. — Derselbe, Capillaranalyse. Basel 1906. Dresden 1910.

[3]) Pelet-Jolivet, Theorie des Färbeprozesses, Dresden 1910, S. 120ff. — Zsigmondy, Kolloidchemie, Leipzig 1912, S. 227ff.

e) Elektrolytfällung.

Auch die Untersuchung der Elektrolytflockung ließ keine brauchbaren Ergebnisse erwarten, da hier ebenfalls der Elektrolytgehalt der Farbstoffe von großem Einfluß auf die Resultate sein mußte. Der Versuch bestätigte diese Erwartung durchaus.

Tabelle II.

Verhalten der Farbstofflösungen gegenüber Elektrolytzusatz.

Farbe Nr.	Kubikzentimeter KCl-Lösung						Verhalten bei intravenöser Injektion
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	
436	T	+	++	++	++	+++	10 ccm filtr. 1% kalt ber. Lösg. +
							10 „ „ 1% heiß „ „ E
437	+	+	+	++	++	+++	10 „ „ 1% kalt „ „ +
							16 „ „ 1% „ „ „ E
							20 „ „ 1% „ „ „ E
438	++	+++	+++	+++	+++	+++	10 „ „ 1% „ „ „ E
439	—	—	—	—	T	+	10 „ „ 1% „ „ „ +
							16 „ „ 1% „ „ „ +
440	—	—	—	—	—	—	10 „ „ 1% „ „ „ +
441	—	—	—	—	—	—	10 „ „ 1% „ „ „ E
							10 „ „ 1% „ „ „ E
							10 „ „ 0,25% „ „ „ E
442	T	++	++	+++	+++	+++	10 „ „ 1% „ „ „ +
							11 „ „ 1% heiß „ „ E
443	+++	+++	+++	+++	+++	+++	Die heiß gesättigte filtr. Lösg. enthält kaum noch Farbstoff +
444	T	++	++	+++	+++	+++	10 ccm filtr. 1% kalt ber. Lösg. +
445	T	T	T	+++	+++	+++	10 „ „ 1% „ „ „ +
							Stets vorübergehende Krämpfe
							21 ccm filtr. 1% kalt ber. Lösg. +
							Tier 1 Std. nach Injektion tot
446	+	++	++	++	++	++	10 ccm filtr. 1% kalt ber. Lösg. E
168	—	—	—	—	—	—	20 „ „ 1% „ „ „ +
172	T	+	++	++			20 „ „ 1% „ „ „ +

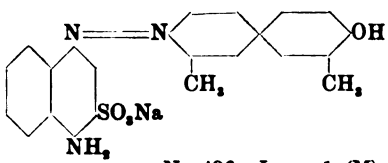
Versuchsanordnung: 1 ccm 0,5%ige Farbstofflösung (bzw. gesättigte filtrierte Lösung, wenn Farbstoff zu 0,5% nicht vollständig löslich war). Versetzt mit 5 ccm Aqua dest. und 0,5 bis 3,0 ccm kalt gesättigter KCl-Lösung.

— = keine Flockung nach 24 Stunden.
T = Trübung.
\+ = beginnende Flockung, Flüssigkeit noch tief gefärbt.
++ = „ „ „ „ schwach „
+++ = vollständige „ „ nahezu oder ganz farblos.

Unter der letzten Rubrik ist:
\+ = bei intravenöser Injektion vertragen.
E = „ „ „ stirbt das Tier unter den Erscheinungen der Embolie.

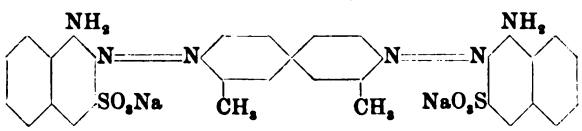
In der Tabelle II ist das Verhalten der Farbstofflösungen zu Elektrolytlösungen dargestellt; daneben finden sich Angaben über das Verhalten bei intravenöser Injektion beim Kaninchen. Die Resultate gehen nicht parallel. So gibt beispielsweise Farbstoff 441 mit Chlorkaliumlösung in den angeführten Konzentrationen keine Fällung, erzeugt aber intravenös Embolie, während die elektrolytempfindlichen Farbstoffe Nr. 444 und 172 (Vitalneurot!) bei intravenöser Injektion glatt vertragen werden

Tabelle III.



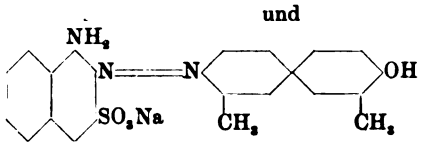
Nr. 436. Isom. 1 (M).

ca. 50%

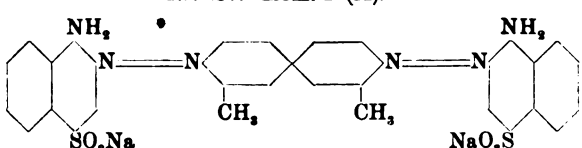


und

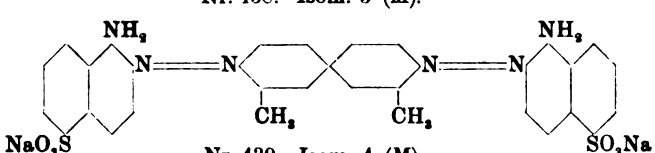
ca. 50%



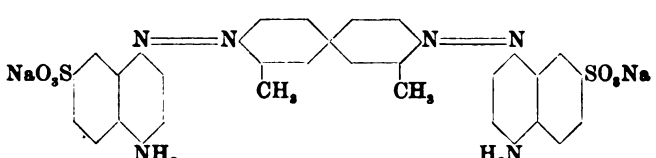
Nr. 437. Isom. 2 (M).



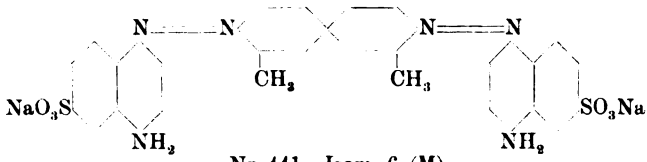
Nr. 438. Isom. 3 (M).



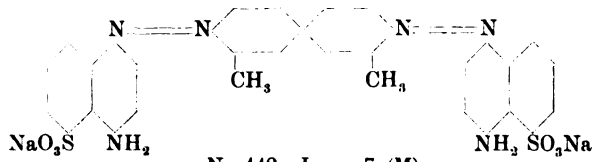
Nr. 439. Isom. 4 (M).



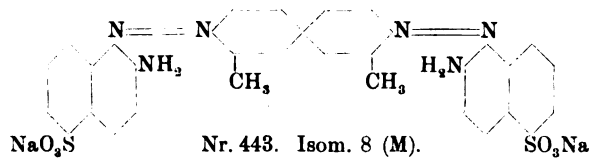
Nr. 440. Isom. 5 (M).



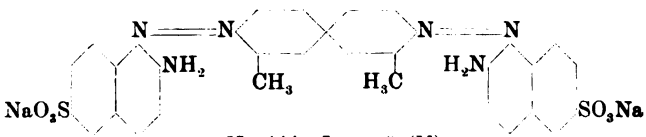
Nr. 441. Isom. 6 (M).



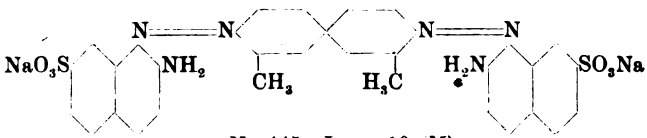
Nr. 442. Isom. 7 (M).



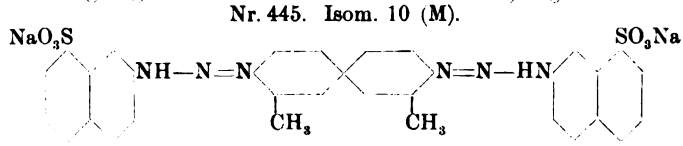
Nr. 443. Isom. 8 (M).



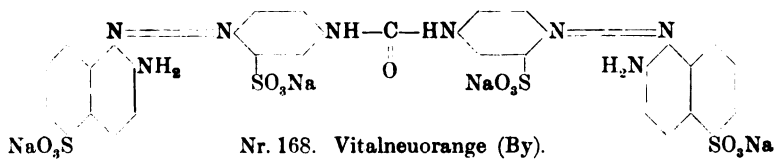
Nr. 444. Isom. 9 (M).



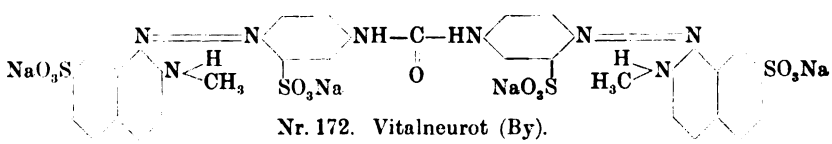
Nr. 445. Isom. 10 (M).



Nr. 446. Isom. 11 (M).



Nr. 168. Vitalneuorange (By).



Nr. 172. Vitalneurot (By).

und schöne allgemeine Vitalfärbung geben. Ähnliche — oft noch schärfere — Unterschiede ergeben sich beim Vergleich der Elektrolytflockung und dem biologischen Verhalten der Farbstoffe bei intraperitonealer Injektion:

Nr. 436 färbt lokal vital, zeigt aber nach vielen Injektionen keine Allgemeinfärbung. Nr. 437 färbt lokal vital, gibt aber nach sehr vielen Injektionen eine sehr schwache allgemeine Färbung. Nr. 438 verhält sich wie 436. Hingegen sind Nr. 439 und 440 allgemeine Vitalfarbstoffe. Nr. 441 färbt nur lokal vital und ist giftig. Nr. 442 färbt ebenso wie 436. Nr. 443 gibt nur lokale Vitalfärbung. Er ist in Wasser fast unlöslich. Allgemeine Vitalfärbung geben wieder Nr. 444 und 445, während sich Nr. 446 wie 437 verhält, jedoch endlich zu etwas intensiverer Allgemeinfärbung als dieser Farbstoff führt. Endlich liefern Farbstoff 168 und 172 in kurzer Zeit eine prachtvolle allgemeine Vitalfärbung. Sie werden ziemlich schnell wieder abgeschieden.

Gesetzmäßigkeiten zeigen sich weder zwischen biologischem Verhalten und Elektrolytflockung noch chemischer Konstitution.

f) Diffusionsgeschwindigkeit.

Brauchbare Resultate aber versprach die Bestimmung der Diffusionsfähigkeit bzw. Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe. Aber auch hier war eine besondere Auswahl unter den möglichen Methoden notwendig.

α) Pergamenthülsen.

Die Diffusionsfähigkeit läßt sich zwar durch Anwendung von Pergamentschläuchen oder Kollodiummembranen im Dialysierversuch prüfen, doch bewährte sich die Methode nicht. Ganz gleichmäßige Pergamenthülsen sind kaum zu erhalten, wie ja auch v. Möllendorff neuerdings bei seinen Versuchen erfuhr. Die Adsorption der Farbstoffe an die verwendete Scheidewand ist häufig sehr erheblich und stört die Resultate. Die Beobachtung ist schwierig und namentlich in quantitativer Hinsicht nicht frei von subjektiver Betrachtung. Der Anwendung des Colorimeters stehen vielerlei Bedenken entgegen. Vergleiche zwischen verschiedenfarbigen Lösungen sind wohl nur mit dem Spektralphotometer möglich. Eine Kontrollreihe nach dieser Methode (Dialyse durch Pergamenthülsen) wurde

in der Harnstoffarbstoffreihe ausgeführt und wird dort diskutiert werden.

β) Freie Diffusion.

Die Messung der freien Diffusion in Wasser ist von äußeren Einflüssen weitgehend abhängig und liefert Ergebnisse, die für die einzelnen Farbstoffe zu nahe beieinander liegen (vgl. später).

γ) Gelatinegel.

Brauchbare Resultate lieferte endlich die Messung der Diffusionsgeschwindigkeit in einem $2^0/_0$igen Gelatinegel, deren wir uns auf den Rat von Herrn Geheimrat Schenck bedienten. Die Bestimmungen wurden von Herrn Dr. Felix Wilborn ausgeführt, der vor Ausführung seiner Versuche nichts von dem biologischen Verhalten der einzelnen Farbstoffe wußte. Die überraschende Übereinstimmung, die sich hierauf zwischen biologischem und physikalischem Versuch ergab, ist um so höher zu bewerten, als daher die Versuche frei von subjekiver Betrachtung sind.

2. Diffusionsgeschwindigkeit und Vitalfärbungsvermögen.

Ich teile im folgenden einige Reihen der von Herrn Dr. Wilborn ausgeführten physikalischen Versuche mit und knüpfe an dieselben zugleich die Betrachtungen über Diffusionsgeschwindigkeit und Vitalfärbungsvermögen.

a) Technik der physikalischen Versuche.

Zur Technik der Versuche sei noch bemerkt, daß die Farbstoffe zur gleichen Zeit in gleicher Konzentration (bezogen auf den Handelsfarbstoff bzw. reinere Farbstoffe, genau wie sie im Tierversuch verwendet worden waren) in Wasser gelöst wurden. Gleiche Volumina dieser Farbstofflösungen wurden entsprechenden — unter sich gleichen — Volumina von Gelatinelösung zugesetzt. Gleiche Volumina der so gefärbten Gelatinelösungen wurden in Reagensgläser gefüllt, zum Erstarren gebracht und mit gleichen Volumina ungefärbter Gelatinelösung überschichtet. Die aufgeschichtete Gelatinelösung hatte die gleiche Konzentration wie die gefärbte Gelatinelösung nach ihrer Mischung mit der Farbstofflösung. Nach dem Erstarren wurde eine Millimeterskala angeklebt und nun täglich der Stand der Farbstoffgrenze abgelesen.

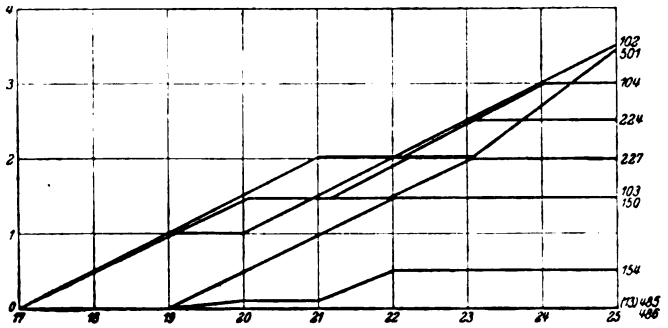


Fig. 1.

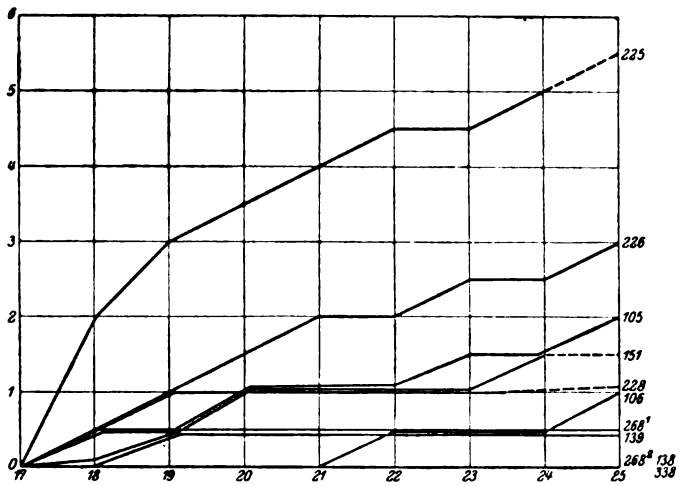


Fig. 2.

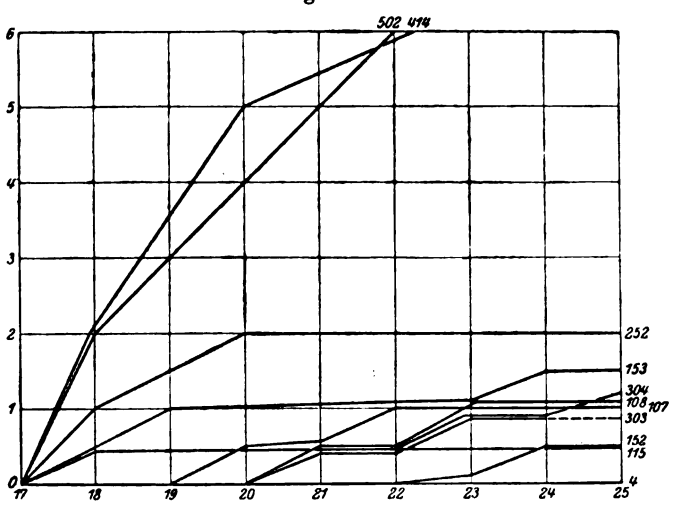


Fig. 3.

Tabelle

Trypanblau-
Diffusion in 2%igem
begonnen am

Datum	103	102	104	(13	485	150	227	224	501	486	154	268	268	138	225	226	106
18. XI.	—	0,5	0,5	—	—	—	0,5	0,5	0,5 d	—	—	0,5 d	—	Sp.	2	0,5	—
19.	—	1	1	—	—	—	1	1	1 d	—	—	0,5 d	—	Sp.	3	1	—
20.	0,5	1	1,5	—	—	0,5	1,5	1,5	1,5 d	—	Sp	0,5 d	—	Sp.	3,5	1,5	—
21.	1	1,5	2	—	—	1	1,5	2	1,5 d	—	Sp.	0,5 d	— d	Sp.	4	2	rote Farbe
22.	1,5	2	2	—	—	1,5	1,5	2	2 d	—	0,5	0,5 d	—	—	4,5	2	0,5
23.	1,5	2,5	2,5	—	—	1,5	2	2,5 d	2 d	—	0,5	0,5 d	—	—	4,5	2,5	0,5
24.	1,5	3	3	—	—	1,5	2	2,5	3,5 d	—	0,5	0,5 d	—	—	5	2,5	0,5
25.	1,5	3,5	3	—	—	1,5	2	2,5	und.	—	0,5	0,5 d	—	—	und.	3	0,5—1
26. XI.	2	und.	3,5	—	—	2	2,5	3	und.	—	0,5	0,5 d	—	—		3,5	0,5—1
27.	2,5		3,5	—	—	2	2,5	3		—	0,5	0,5 d	0,5	—		3,5	0,5—1
28.	2,5		4	—	—	2,5	2,5	3		—	0,5	0,5 d	0,5	—		3,5	1
29.	2,5		4	—				3			0,5	0,5 d	0,5	—		<4	1
30.	3		4	—	—	2,5	2,5	3		—	0,5	0,5	0,5	—		4	1
2. XII.	3		und.	—	—	2,5	und	3		—	0,5	—	0,5	—		4	1
3.	3			—	—	3		und.		—	0,5	d	0,5	—		4	1
9.											0,5						

Verwendet wurden frische 0,1%ige Lösungen; lösten sich die Farbstoffe nicht vollständig auf, so wurde die 0,1%ige Suspension benutzt.

Aus Nr. 268 diffundiert ein violetter Farbstoff schnell heraus, während der ursprüngliche Farbstoff die oben angegebene Diffusionsgeschwindigkeit zeigt.

Aus Nr. 303 diffundiert sehr rasch ein gelber Farbstoff heraus (in 5 Tagen 20 mm), während der ursprüngliche Farbstoff die oben angegebene Diffusionsgeschwindigkeit zeigt.

Jede Versuchsreihe ist gleichzeitig angesetzt und für jeden Farbstoff in der Reihe dieselbe Gelatinelösung verwendet. Die Vorgeschichte der Reagenzien ist also innerhalb einer Reihe für jeden einzelnen Versuch genau identisch. Auch während der ganzen Zeit der Messungen befand sich jede Reihe unter genau denselben äußeren Bedingungen. Innerhalb einer Reihe sind die Ergebnisse also vergleichbar. Vergleiche mehrerer Reihen untereinander sind nur mit geringer Sicherheit möglich.

Zweckmäßig ist es, steril zu arbeiten, um nicht durch Pilzvegetationen gestört zu werden.

Die Fehlergrenze liegt meist innerhalb eines halben Millimeters, kann aber größer werden, wenn die Farbstoffgrenze

IV.

reihe.

Gelatinegel

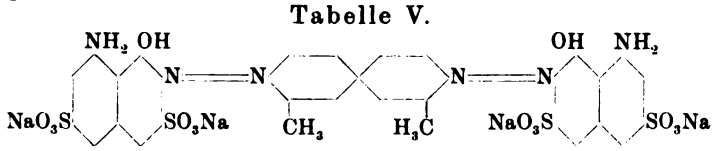
17. XI. 1912.

105	151	228	139	338	108	502	152	153	107	4	115	252	303	304	414
0,5	Sp.	0,5	—	—	—	1 Tag später ausgesetzt	—	0,5	—	—	0,5	1	— gelb d.	0,5	2
0,5	0,5	1	0.5	—	—	2	—	1	—	—	0,5	1,5	—	0,5	3,5
1	1	1	0,5	—	—	3	—	1	0,5	—	0,5	2	—	0,5	5
1	1	1	0,5	—	0,5	4	—	1	0,5	—	0,5	2	0,5	0,5	5,5
1	1	1 d	0,5	—	0,5	5	—	1	1	—	0,5	2	0,5	0,5	6
1,5	1	1 d	0,5	—	1	6	Sp.	1	1	—	0,5	2	0,5—1	0,5—1	7
1,5	1,5	und.	0,5	—	1	und.	0,5	1,5	1	—	0,5	2	und.	0,5—1	7
2	und.		0,5	—	1	und.	0,5	1,5	1	—	0,5	2		1	8
2			0,5	—	1		0,5	1,5	1	—	0,5	2		1	9
2,5			0,5	—	1		0,5	1,5	1,5	—	0,5	2		1	9,5
2,5			0,5	—	>1		0,5	1,5	1,5	—	0,5	2,5		1	10
2,5			0,5	—	1,5		—	1,5	1,5		—	2,5		1	
2,5			0,5	—	1,5		0,5	1,5	1,5	—	0,5	und.		1	11
3			0,5	—	1,5		0,5	1,5	1,5	—	0,5			1	11
3			—	—	1,5		0,5 (?)	1,5	1,5	—	—			1 1,5	und.

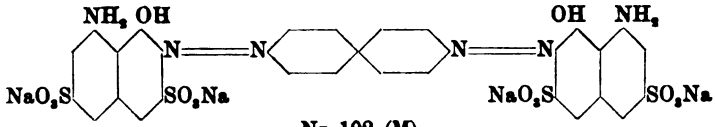
diffus wird. Dies ist stets besonders bemerkt. Kathetometrische Ablesung war nicht möglich, da die Grenzen nie ganz scharfe waren. Um einen besseren Überblick über den Ablauf der Versuche zu erhalten, sind die Werte in ein Koordinatensystem eingezeichnet worden unter Eintragung der Millimeter auf der Horizontalen, der Tage auf der Vertikalen. Da die Zahlen nur Näherungswerte innerhalb $\pm$ 0,5 mm darstellen, wurde von der Darstellung in Kurven Abstand genommen und nur die entsprechenden Punkte durch gerade Linien verbunden. Dies erklärt das etwas absonderliche Aussehen der „Kurven", wie ich im folgenden trotzdem kurz von dieser Art der graphischen Darstellung sprechen will.

Besondere Einzelheiten sind jeweils in den Tabellen angegeben.

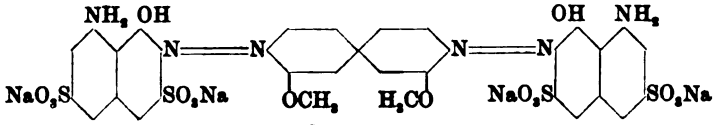
Tabelle V.



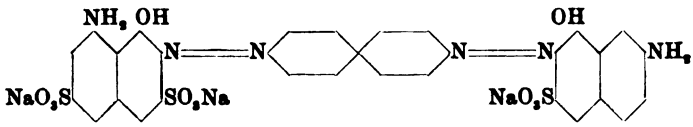
Nr. 103 (M).



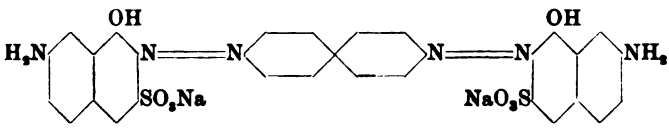
Nr. 102 (M).



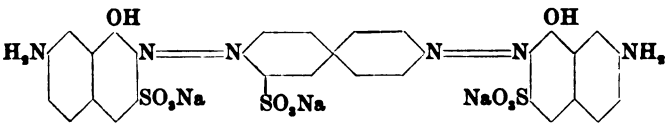
Nr. 104 (M).



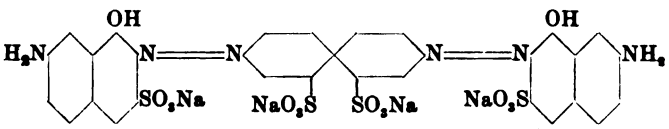
Nr. 13. Diaminschwarz BH (C).



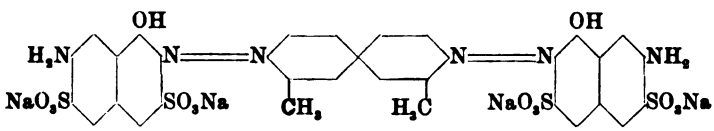
Nr. 485. Oxaminschwarz 2R techn. rein (B).



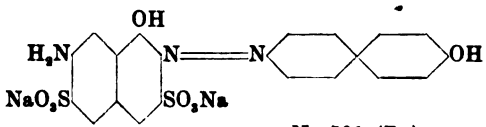
Nr. 150 (M).



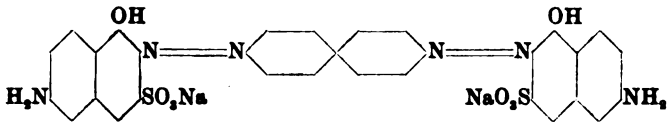
Nr. 227 (M).



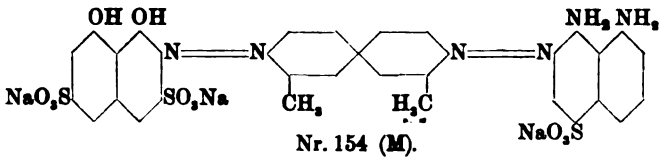
Nr. 224 (M).



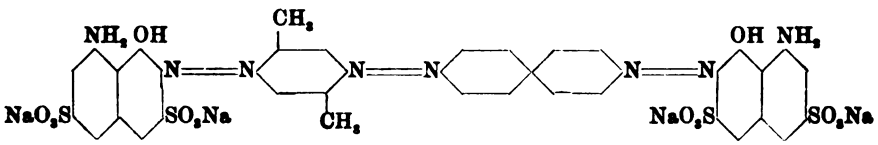
Nr. 501 (By).



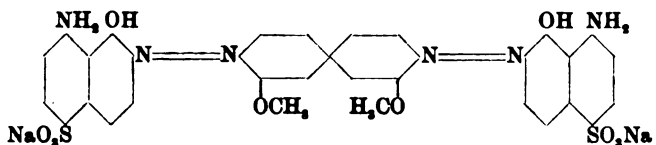
Nr. 486. Oxaminviolett techn. rein (B).



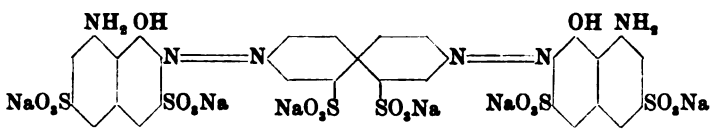
Nr. 154 (M).



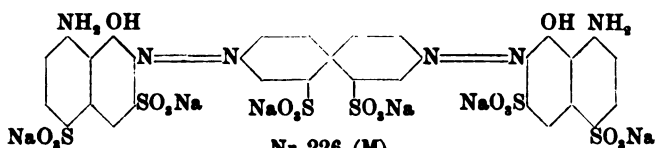
Nr. 268. Diaminbetaschwarz B pat. (C).



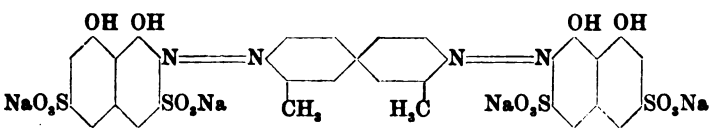
Nr. 138. Chicagoblau B (A); cf. Nr. 338.



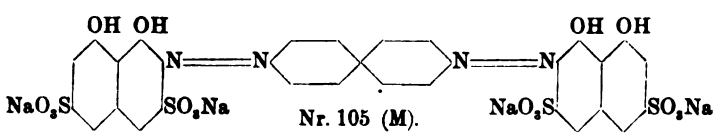
Nr. 225 (M).



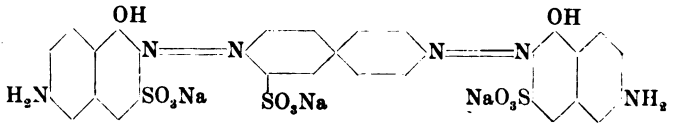
Nr. 226 (M).



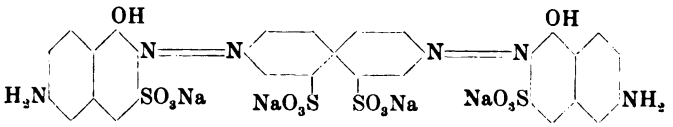
Nr. 106 (M).



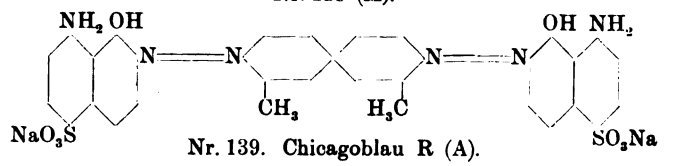
Nr. 105 (M).



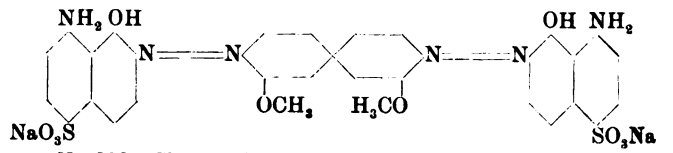
Nr. 151 (M).



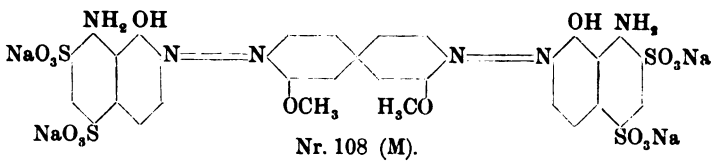
Nr. 228 (M).



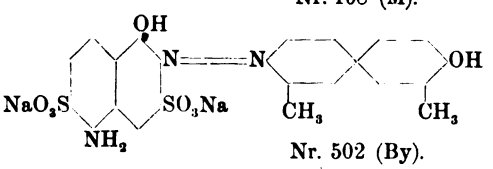
Nr. 139. Chicagoblau R (A).



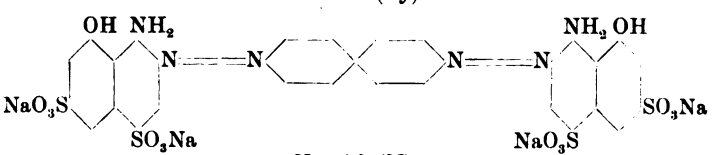
Nr. 338. Chicagoblau B (A) fast salzfrei; cf. Nr. 138.



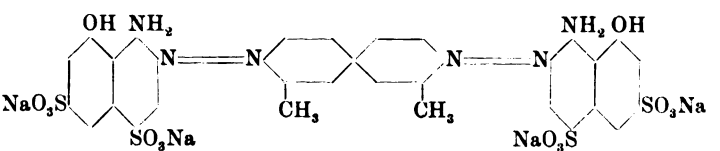
Nr. 108 (M).



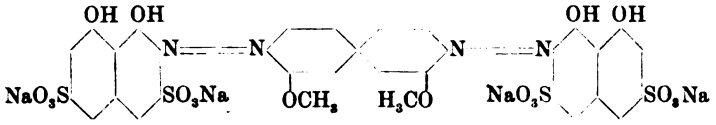
Nr. 502 (By).



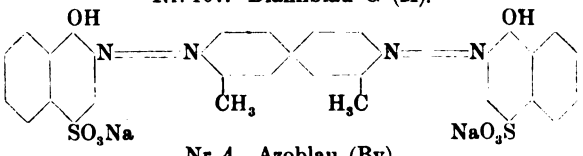
Nr. 152 (M).



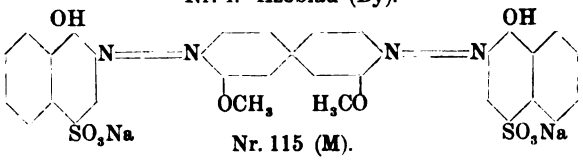
Nr. 153 (M).



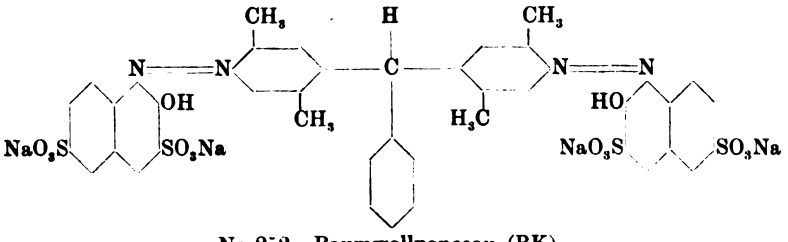
Nr. 107. Dianilblau G (M).



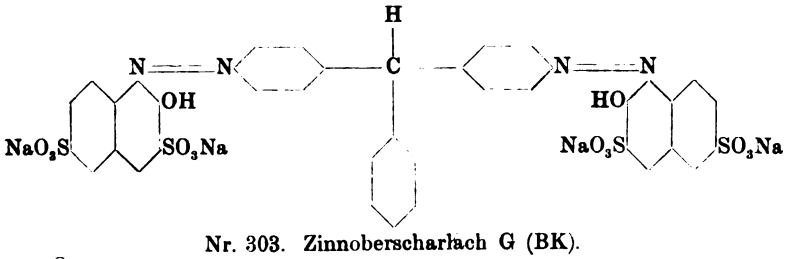
Nr. 4. Azoblau (By).



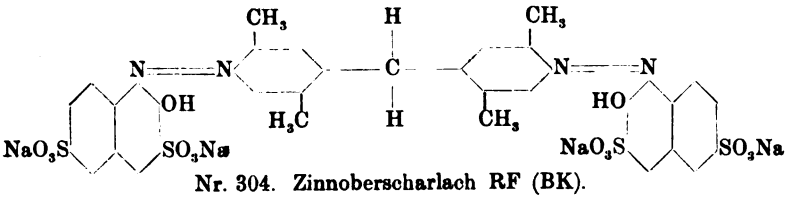
Nr. 115 (M).



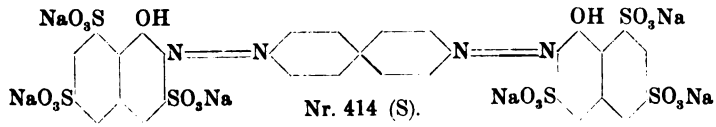
Nr. 252. Baumwollponceau (BK).



Nr. 303. Zinnoberscharlach G (BK).



Nr. 304. Zinnoberscharlach RF (BK).



Nr. 414 (S).

Tabelle VI.

Klasse	Diff.-Geschw. mm	Nach 8 Tagen Farbstoff Nr.	Nach 13 Tagen Farbstoff Nr.
1	0	(13). 485. 486. 268[2]. 138. 338. 4	(13). 485. 486. 138. 338. 4
2	0—1	154. 268[1]. 106. 139. 152. 115. 303	154. 268[1.2]. 139. 152. 115
3	1	228. 108. 107. 304	106. 304
4	1—2	103. 150. 151. 153	108. 153. 107
5	2	227. 105. 252	
6	2—3	224	150. 227. 105
7	3	104. 226	103. 224
8	3—4	102	
9	4		104. 226
10	4—5		
11	5	225	
12	höher	502. 414	

b) Trypanblaureihe.

Trypanblaureihe.

Zur Zeichnung der „Kurven" wurden nur die ersten 8 Anfangswerte berücksichtigt, da später durch Verwischung der Farbstoffgrenze bei einigen Farbstoffen die Ablesungsfehler zu groß werden.

Um einen klaren Überblick zum Vergleich mit dem biologischen Verhalten zu erhalten, sind in Tabelle VI die Farbstoffe in Klassen nach ihrer Diffusionsgeschwindigkeit geordnet, und zwar für eine Versuchsdauer von 8 Tagen und von 13 Tagen. In diese letzte Reihe sind nur die Farbstoffe aufgenommen, die noch scharfe Grenzen zeigten.

Unter den Farbstoffen der ersten Klasse, die keine Diffusionsgeschwindigkeit zeigen, befindet sich nur der Farbstoff Nr. 13, der — langsam zwar — zu allgemeiner Vitalfärbung führt. Hier liegen aber besondere Verhältnisse vor. Das verwendete Farbstoffmuster stammt aus dem Jahr der Erfindung des Farbstoffes und enthält ganz unverhältnismäßig höhere Mengen von anorganischen Salzen als die sonst verwendeten Farbstoffe. Dieser hohe Elektrolytgehalt stört den Diffusionsversuch, während im Tierversuch infolge der raschen Resorption der Elektrolyte eine reinere Farbstoffwirkung zum Ausdruck kommt. Eine Kontrolle mit einem reineren Muster war nicht mehr möglich, da der Krieg die Arbeit unterbrach. Sonst zeigen:

Klasse	1.	Farbstoff	Nr.	485.	Lokale Vitalfärbung, nach sehr vielen Injektionen schwächste Allgemeinfärbung[1]).
			„	486.	Nur lokale V.
			„	268[2].	Lokale V., auch V. in der näheren Umgebung des Injektionsortes. Nach mehreren Injektionen schwache A.
			„	138.	Nur lokale V.
			„	338.	Nur lokale V.
			„	4.	Nur lokale V.
„	2.	„	„	154.	Lokale V. auch in Umgebung. Nach mehreren Injektionen schwache A.
			„	268[1].	cf. Klasse 1.
			„	106.	Langsame A.
			„	139.	Nur lokale V.
			„	152.	Lokale V. auch in Umgebung, endlich schwache A.
			„	115.	Lokale V., allgemein sehr schwach, nur Niere stärker vitalgefärbt.
			„	303.	Giftig. Langsame A.
„	3.	„	„	228.	Gute A.
			„	108.	Giftig. Gute A.
			„	107.	Giftig. Gute A.
			„	304.	Giftig. Mäßige A.
„	4.	„	„	103.	Trypanblau. Sehr gute A.
			„	150.	Sehr gute A. wie 103.
			„	151.	Sehr gute A. wie 103.
			„	153.	Mäßige A.
„	5.	„	„	227.	Rasche, sehr gute A.
			„	105.	Sehr gute A. wie 103.
			„	252.	Sehr gute A. wie 103.
„	6.	„	„	224.	Rasche, sehr gute A.
„	7.	„	„	104.	Giftig. Rasche, sehr gute A.
			„	226.	Sehr rasche, gute A.

[1]) Weiterhin bedeutet V = Vitalfärbung, A = allgemeine Vitalfärbung.

Klasse 8. Farbstoff Nr. 102. Giftig. Rasche, gute A.

„ 11. „ „ 225. Äußerst rasche A., ebenso äußerst schnelle Entfärbung.

„ 12. „ „ 414. In wenigen Stunden ist das Maximum der allgemeinen Vitalfärbung erreicht. Es findet sich neben diffuser Durchtränkung der Zellen nur geringe Speicherung in den Zellen. Nach 24 Stunden völlig entfärbt.

„ 502. Färbt fast noch schneller wie Nr. 414 allgemein und wird ebenso rasch wieder abgeschieden, ohne daß Speicherung in den Zellen zu sehen wäre.

Farbstoff Nr. 501 kann nicht zur Beurteilung herangezogen werden, da er aus einem Gemisch eines rotvioletten asymmetrischen und eines blauvioletten, wohl symmetrischen Farbstoffes besteht. Der rotviolette Farbstoff verhält sich biologisch wie Nr. 502, der blauviolette wird gespeichert. Aus dem physikalischen Versuchsprotokoll ist nicht ersichtlich, von welchem Gemengteil die Diffusionsgeschwindigkeit gemessen wurde.

Tabelle

Benzopurpurinreihe

Diffusion in 2% Gelatinelösung,

Dat.	54	287	92[1])	52	201	288	438	53	202	289	439	203	213	49	200
11.XII.	—	0,5	—	0,5	—	—	—	—	—	—	0,5	—	—	—	—
12.	—	<1	—	1	—	—	—	—	—	—	0,5	0,5	0,5	0,5	—
13.	—	1,5	0,5	1	—	—	—	—	—	—	0,5	1	0,5	1	0,5
14.	0,5	1,5	1	1	—	—	—	—	—	—	1	1	0,5	1	<1
15.	1	1,5	1	1	—	0,5	—	—	—	—	1	1	0,5	1	1
16.	1	1,5	1	1 ,5	—	0,5	—	—	—	—	1	1	0,5	1	1,5
17.	1	>1,5	1,5	1 ,5	—	0,5	—	—	—	—	1	1	0,5	1,5	1,5
18.	und.	>1,5	1,5	1,5		0 ,5	—	—	—	—	1	1,5	0,5	1,5	1,5
19.		>1,5	1,5	1,5		0,5	—	—	—	—	1	1,5	<1	1,5	1,5
20.		>1,5	1,5	1,5		0,5	Sp.	—	—	—	1,5	1,5	1	1,5	1,5
21.		>1,5	1,5	1,5		0,5	„	—	—	—	1,5	1,5	1	1,5	1,5
22.		2	1,5	1,5		1	„	—	—	—	1,5	1,5	1	1,5	1,5
23.		2	1,5	1,5		1	„	—	—	—	1,5	1,5	1	1,5	1.5

[1]) Bei 92 diffundiert eine hellere Zone als die unterste Lösung. Die eigent-

Von den in dieser Reihe enthaltenen 32 Farbstoffen scheiden Nr. 13 und 501 wegen der oben genannten besonderen Verhältnisse aus der Betrachtung aus. Bei den übrigen 30 Farbstoffen findet sich weitestgehende Parallelität zwischen der Diffusionsgeschwindigkeit und dem Vitalfärbungsvermögen der Farbstoffe.

Ist die Diffusionsgeschwindigkeit Null oder sehr klein, so färbt der Farbstoff nur lokal oder auch in der näheren Umgebung des Injektionsortes vital. Mit wachsender Diffusionsgeschwindigkeit gewinnt der Farbstoff immer mehr das Vermögen, allgemein vitalzufärben. Wird die Diffusionsgeschwindigkeit noch größer, so tritt die allgemeine Vitalfärbung rascher ein, um auch rascher wieder zu verschwinden. Bei sehr hoher Diffusionsgeschwindigkeit spielt sich der Färbungs-Entfärbungs-Vorgang sehr rasch ab, wobei es nur zu geringer oder auch gar keiner Farbstoffspeicherung mehr kommt.

Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß die einzelnen Klassen nur Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit von $^1/_2$ mm zeigen. Die Fehlergrenze liegt aber bei $\pm\ ^1/_2$ mm, so daß es nicht zu verwundern ist, wenn ein Farbstoff in einer Klasse ein Vitalfärbungsvermögen zeigt, daß der nächst höheren oder niedrigeren Klasse entspricht. Denkt man noch daran, daß

VII.

[frische Farbstofflösungen].

begonnen am 10. Dezember 1912.

444	87	86	206	208	207	183	204	205	445	322	229	230	440	441	442	273
—	—	—	1	0,5	2	2	—	—	—	—	0,5	1	0,5	0,5	—	—
—	1	0,5	1	<1	3	3	0,5	—	0,5	0,5	1,5	2,5	0,5	0,5	—	—
—	1,5	1,5	1,5	1	4	4	0,5	—	1	0,5	>2	3,5	0,5	0,5	—	0,5
—	2	>2	1,5	1,5	4	5	>1	—	>1	0,5	3	5	>0,5	0,5	—	1
—	2,5	2	1,5	1,5	4	5	1	—	>1	0,5	3,5	5	1	0,5	—	1,5
—	2,5	2	1,5	1,5	5	5,5	1	—	1	0,5	3,5	5	1	1	—	1,5
0,5	3	2	1,5	>1,5	5,5	6	1,5	—	1,5	1	4	5,5	1	1	—	2
0,5	3	2,5	1,5	2	6	6,5	1,5	—	1,5	1	4,5	5,5	1,5	1	—	2,5
0,5	3	3	1,5	2	6,5	7	>2	—	1,5	1	5	6	1,5	1	—	3
0,5	3,5	3	1,5	2,5	7	7,5	2	—	1,5	1	6	6	1,5	1,5	—	3,5
0,5	3,5	3	1,5	2,5	7,5	8	2,5	—	1,5	1	6,5	6,5	1,5	1,5	—	3,5
0,5	4	3	1,5	2,5	8	und.	2,5	—	1,5	1	6,5	7	1,5	1,5	—	3,5
0,5	4	3	1,5	2,5	8		2,5	—	1,5	1	7	7,5	1,5	1,5	—	4

liche Grenze verschiebt sich nicht.

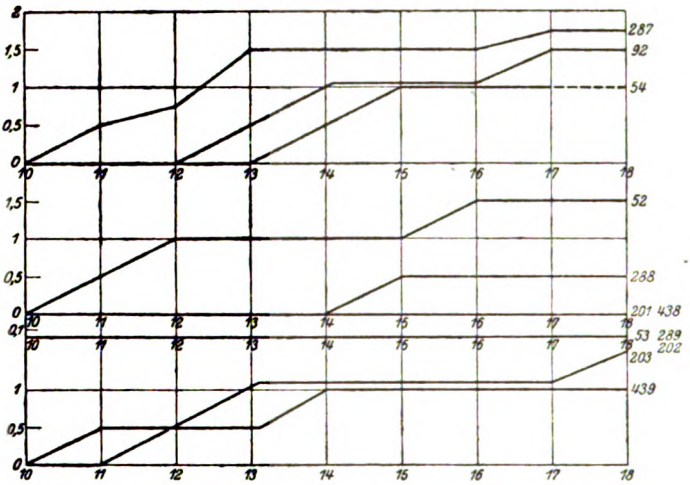


Fig. 4.

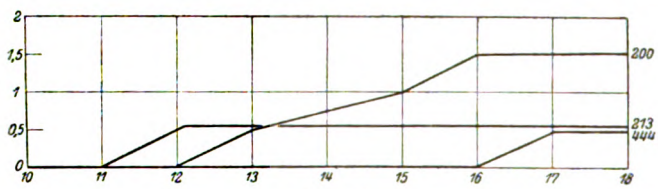


Fig. 5.

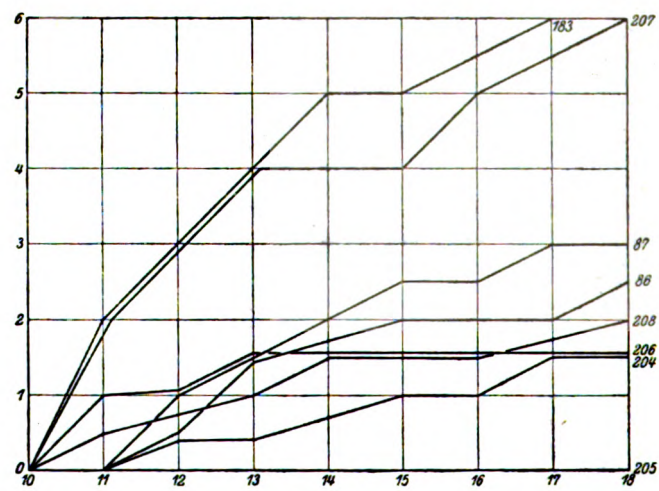


Fig. 6.

auch der Elektrolytgehalt der einzelnen Farbstoffe ein verschiedener ist, was im physikalischen Versuch weit mehr zum Ausdruck kommt als im Tierversuch, so ist das übereinstimmende Verhalten der Farbstoffe bezüglich Diffusionsgeschwindigkeit und Vitalfärbungsvermögen ein vorzügliches. Es würde noch klarer werden, wenn die Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit

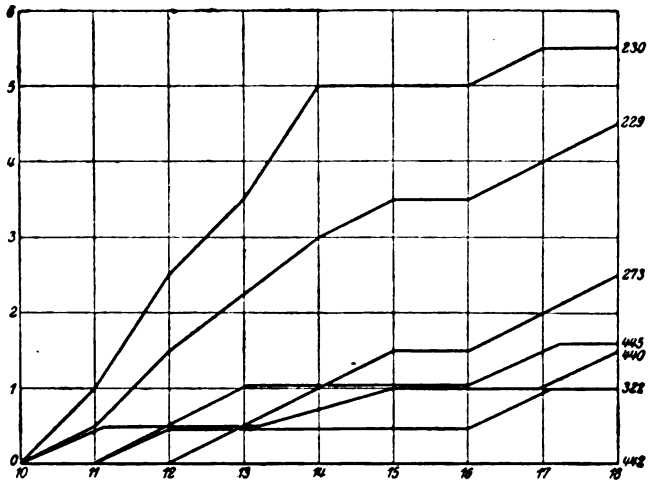
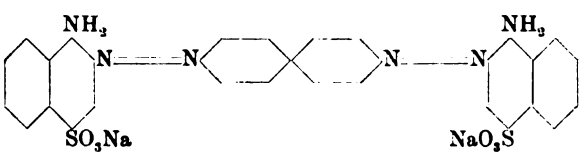


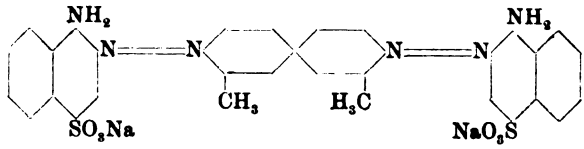
Fig. 7.

länger fortgesetzt werden könnte, da dann die Differenzen zwischen den einzelnen Farbstoffen größere würden. Ein Vergleich der Klasseneinteilung der Farbstoffe nach der Diffusionshöhe nach 13 Tagen, die bei einigen Farbstoffen bestimmt werden konnte, mit dem Vitalfärbungsvermögen lehrt dies (cf. die Tabellen).

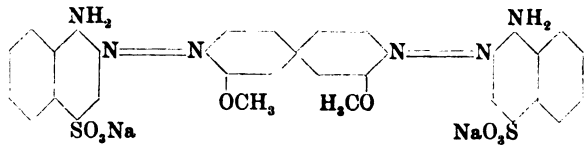
Tabelle VIII.



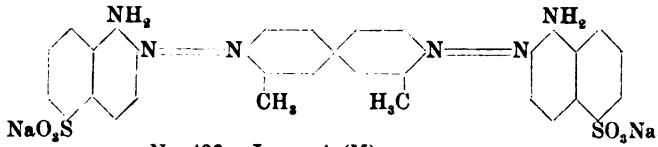
Nr. 54. Baumwollrot 4 B (Gr. E.).
„ 287. Dianilrot extra stark (M).
„ 92. Kongo (A).



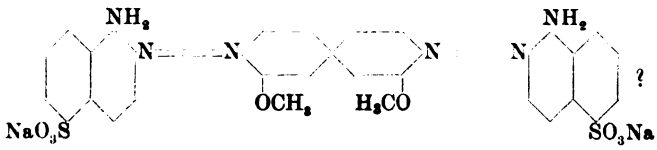
Nr. 52. Benzopurpurin 4 B (Gr. E.).
„ 201. Benzopurpurin 4 B (Grübler).
„ 288. Dianilrot 4 B konz. (M).
„ 438. Isom. 3 (M).



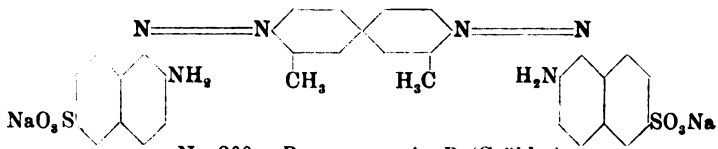
Nr. 53. Benzopurpurin 10 B (Gr. E.).
„ 202. Benzopurpurin 10 B (Grübler).
„ 289. Dianilrot 10 B konz. (M).



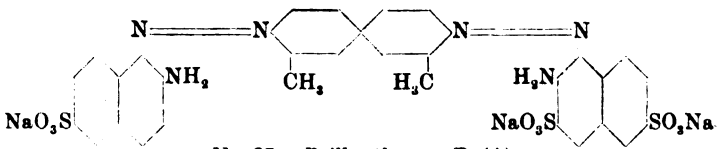
Nr. 439. Isom. 4 (M).
Nr. 203. Benzopurpurin 6 B (Grübler).



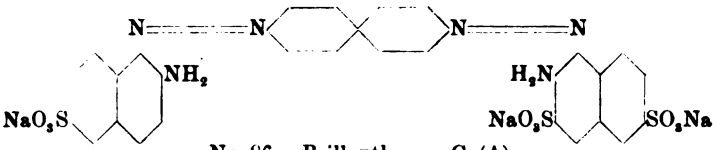
Nr. 213. Diazurin B (By) cf. Schultz V. Nr. 406.



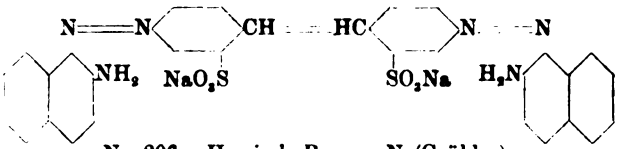
Nr. 200. Benzopurpurin B (Grübler).
Nr. 444. Isom. 9 (M).



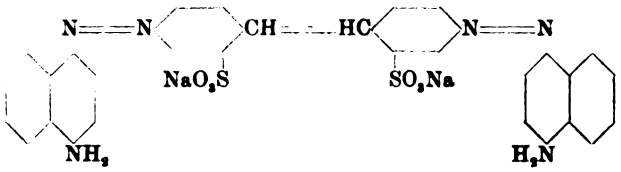
Nr. 87. Brillantkongo R (A).



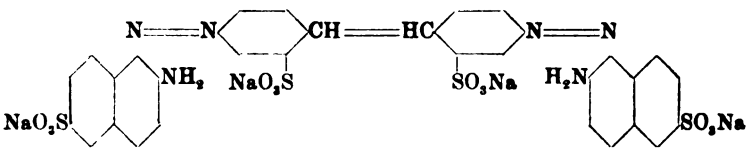
Nr. 86. Brillantkongo G (A).



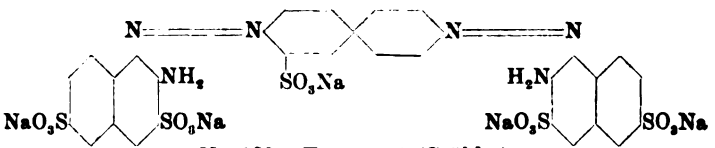
Nr. 206. Hessisch Purpur N (Grübler).



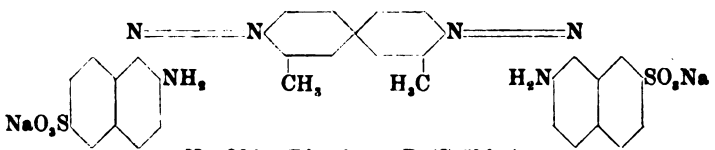
Nr. 208. Hessisch Bordeaux (Grübler).



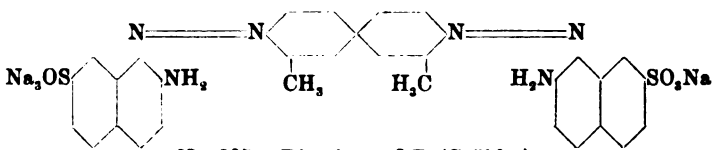
Nr. 207. Hessisch Brillant Purpur (Grübler).



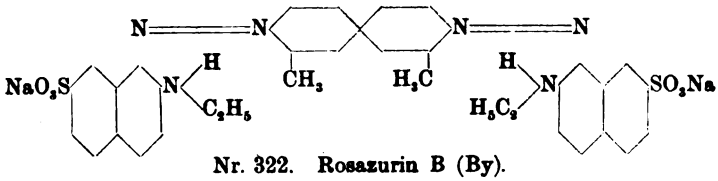
Nr. 183. Trypanrot (Grübler).



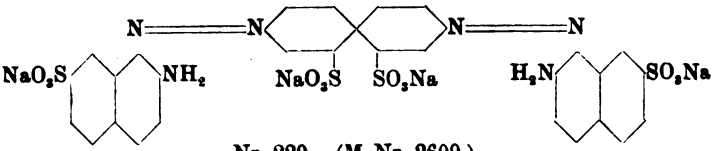
Nr. 204. Diaminrot B (Grübler).



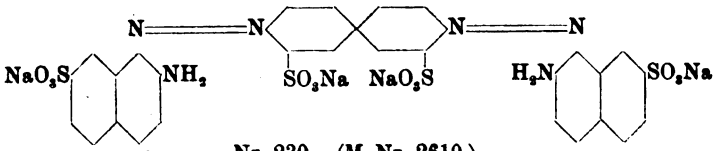
Nr. 205. Diaminrot 3 B (Grübler).
Nr. 445. Isom. 10 (M).



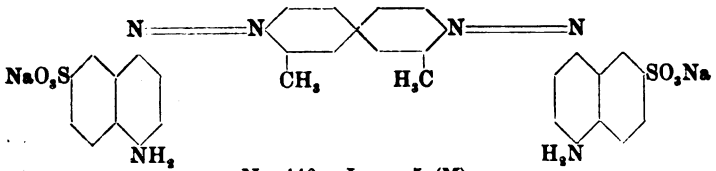
Nr. 322. Rosazurin B (By).



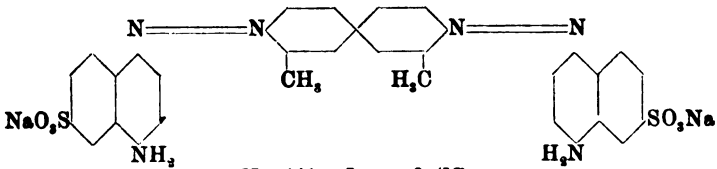
Nr. 229. (M Nr. 2609.)



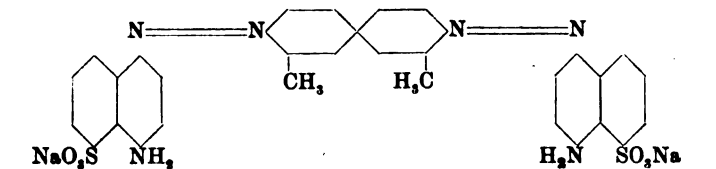
Nr. 230. (M Nr. 2610.)



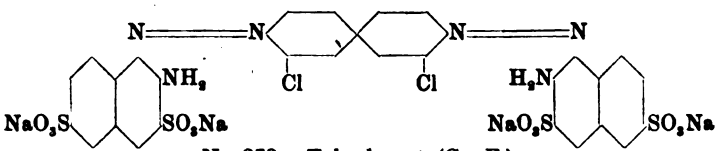
Nr. 440. Isom. 5 (M).



Nr. 441. Isom. 6 (M).



Nr. 442. Isom. 7 (M).



Nr. 273. Toluylenrot (Gr. E.).

Tabelle IX.

Benzopurpurinreihe [frische Farbstofflösungen].

Klasse	Diffusionsgeschwindigkeit in mm	Nach 8 Tagen Farbstoff Nr.	Nach 13 Tagen Farbstoff Nr.
1	0	92. 201. 438. 53. 202 289. 205. 442	92. 438. 53. 202. 289 205. 442
2	0—1	288. 213. 444	444
3	1	54. 439. 322. 441	288. 213. 322
4	1—2	287 (92) 52. 203. 200 206. 204. 445. 440	(92) 52. 439. 203. 200 206. 445. 440. 441
5	2	208	287
6	2—3	86. 273	208. 204
7	3	87	86
8	3—4		273
9	4		87
10	4—5	229	
11	5		
12	5—6	230	
13	6	207	
14	6—7	183	
15	7		229
16	7—8		230
17	8		207 (183)

c) Benzopurpurinreihe.

Genau den gleichen Verhältnissen begegnen wir bei den Farbstoffen der Benzopurpurinreihe, die wir in der gleichen Weise wie die der Trypanblaureihe betrachten wollen.

α) Frische Lösungen.

Zunächst wurde (am 10. XII. 1912) die Diffusionsgeschwindigkeit frisch dargestellter Farbstofflösungen in 2 %igem Gelatinegel untersucht. Tabelle VII bringt wieder die Farbstoffe geordnet nach Klassen entsprechend der Diffusionsgeschwindigkeit. Ihnen entspricht folgendes biologisches Verhalten der Farbstoffe:

Klasse 1. Farbstoff Nr. 92. Giftig, nur lokale V.

„ 201. Nach 3 Injektionen nur lokale V.; nach 7 Injektionen auch in der Umgebung der Injektionsstelle V., aber allgemein keine Färbung.

„ 438. Nach 4 Injektionen nur lokale V.; nach 9 Injektionen V. in Umgebung ausgedehnt, aber keinerlei A.

Klasse	1.	Farbstoff	Nr. 53.	Nur lokale V.
			„ 202.	Nur lokale V.
			„ 289.	Nur lokale V.
			„ 205.	Selbst nach 10 Injektionen nur lokale V.
			„ 442.	Nach 5 Injektionen nur lokale V.; nach 11 Injektionen starke V. an Injektionsort und Umgebung, allgemein nur unsicher nachweisbare äußerst schwache Färbung.
„	2.	„	„ 288.	Nur lokale V.
			„ 213.	Ausgedehnte lokale V.
			„ 444.	Starke lokale V.; nach 4 Injektionen auch A.
„	3.	„	„ 54.	Giftig, nur lokale V.
			„ 439.	Nach 9 Injektionen starke lokale V., schwache A.
			„ 322.	Nur lokale V.
			„ 441.	Giftig, nur lokale V.
„	4.	„	„ 287.	Lokale V.; nach 6 Injektionen A. durch Blaufärbung der Zellgranula mit HCl nachweisbar.
			„ 92.	(Cf. Tabelle.)
			„ 52.	Nur lokale V.
			„ 203.	Nur lokale V.
			„ 200.	Kalt bereitete frische Lösung gibt langsame A.; warm bereitete oder alte Lösungen geben nur starke lokale V. und schwache A. nach mehreren Injektionen und langer Zeit.
			„ 206.	Nur lokale V.
			„ 204.	Nach 4 Injektionen mittelmäßige A.
			„ 445.	Nach 5 Injektionen A.
			„ 440.	Langsame A.
„	5.	„	„ 208.	Starke lokale V., schwache A.
„	6.	„	„ 86.	Langsame gute A.

Klasse	6.	Farbstoff	Nr. 273.	Frische kalt bereitete Lösungen sehr gute A.; alte oder warm bereite Lösungen langsame A.
„	7.	„	„ 87.	Etwas schneller als 86, sehr gute A.
„	10.	„	„ 229.	Sehr gute A.
„	12.	„	„ 230.	Sehr gute A.
„	13.	„	„ 207.	Sehr gute A.
„	14.	„	„ 183.	Giftig in größeren Dosen, aber sehr gute A.

Auch in dieser Reihe von Farbstoffen findet sich eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des physikalischen und des Tierversuchs. Es ist noch notwendig, darauf hinzuweisen, daß sich gerade in dieser Reihe solche Farbstoffe finden, deren Lösungseigenschaften in hohem Grade von äußeren Einflüssen abhängen. Ich hebe besonders Nr. 200 und 444: Benzopurpurin B und Nr. 273 Toluylenrot (vgl. S. 38) hervor. Diese Farbstoffe werden durch höheren Elektrolytgehalt sowie Konzentration und Vorgeschichte der Lösung stark verändert in ihrem Verhalten in wäßriger Lösung. Sie neigen außerdem sehr zur Gelbildung. Im Tierversuch gleichen sich bei intraperitonealer Injektion diese Verhältnisse, wenn auch langsam, einigermaßen aus. Im physikalischen Versuch aber zeigt nach dem Gelatinezusatz namentlich das sehr empfindliche Benzopurpurin B Neigung zur Agglutination. Daher finden wir die Farbstoffe 200, 444 und 440, obwohl sie — wenn auch nur mäßige — allgemeine Vitalfärbung geben, in den Klassen 2 und 4. Im übrigen zeigen die Farbstoffe mit gar keinem oder nur geringem Diffusionsvermögen, die den untersten Klassen (1—5) angehören, auch nur lokales und gar kein oder nur geringes allgemeines Vitalfärbungsvermögen. Diejenigen Farbstoffe aber, die als wirklich gute allgemeine Vitalfarbstoffe bezeichnet werden können, haben ein durchweg erheblich höheres Diffusionsvermögen und ordnen sich alle in die höheren Klassen (6, 7, 10—14) ein. Unter ihnen nimmt mit steigender Diffusionsgeschwindigkeit auch das Vermögen, schneller allgemein vital zu färben, zu. Sehr schnell diffundierende Farbstoffe sind in der Reihe dieser 32 Verwandten des Benzopurpurins nicht enthalten. So fehlen auch hier die rasch den Körper durcheilenden Farbstoffe vollständig.

β) Alte Lösungen.

Ich deutete früher bereits darauf hin, daß mit zunehmendem Alter mancher Farbstofflösungen das Vitalfärbungsvermögen immer schlechter wird. Ganz besonders ist dies bei den Benzopurpurinfarbstoffen — vor allem unter den an sich schon langsam vitalfärbenden Farbstoffen — der Fall.

Tabelle X.

Benzopurpurinreihe.

Diffusion in 2%iger Gelatinelösung, begonnen am 23. X. 1912.

Dat.	54	287	92	439	213	49	200	444	87	86	207	183	204	205	445	229	230	440	441	273
24. X.	—	1	—	—	—	1	—	—	—	—	0,5	0,5	—	—	—	—	1	—	—	—
25.	—	1	—d	0,5	—	1	Sp.	—	—	—	0,5	1,5d	—	—	0,5	—	2	—	0,5	—
26.	Sp.	1	—d	0,5	—	1,5	0,5	—	—	—	1	2d	Sp.	—	0,5	0,5	2,5	—	0,5	Sp.
28.	„	1	—d	0,5	—	1,5	0,5	—	—	Sp.	2	2d	0,5	Sp.	0,5	0,5	3	0,5	0,5	0,5
29.	0,5	1,5d	—d	0,5d	—	1,5	1	—	Sp.	1	2	2d	0,5	0,5	1	1	3	0,5	0,5	1
30.	0,5	1,5	—	1	—	1,5	1	—	„	1	2	2,5	1	0,5	1	1,5	4	0,5	0,5	1
31.	0,5	1,5	—	1	—	1,5	1	—	0,5	1,5	2,5	3	1	0,5	1	2	4	1	1	1,5
1. XI.	1	1,5	Sp.	1	—	2	1	—	0,5	1,5	3	4	1	0,5	1	2	4,5	1	1	1,5
2.	1	1,5	„	1	—	2	1	—	0,5	1,5	3	4,5	1	0,5	1	2	4,5	1	1	1,5
4.	1	1,5	„	1	—	2	1	—	0,5	1,5	4	4,5	1,5	1	1	2,5	5	1	1	2
5.	1	1,5	„	1	—	2	1	—	1	1,5	4	4,5	1,5	1	1	2,5	5,5	1	1	2
6.	1	1,5	„	1	—	2	1	—	1	2	4	und.	1,5	1	1	2,5	6	1	1	2
9.	1,5	1,5	„	1	—	2	1	—	1	2	4,5	—	1,5	1	1,5	3	6,5	1	1	2
11.	1,5	1,5	„	1	—	2	1	—	1,5	2	5	—	1,5	1,5	1,5	und.	und.	1	1	2,5

Verwendet wurden 11 Tage alte Lösungen von 0,1%igem Farbstoffgehalt. Der Farbstoff hatte sich stets vollkommen gelöst.

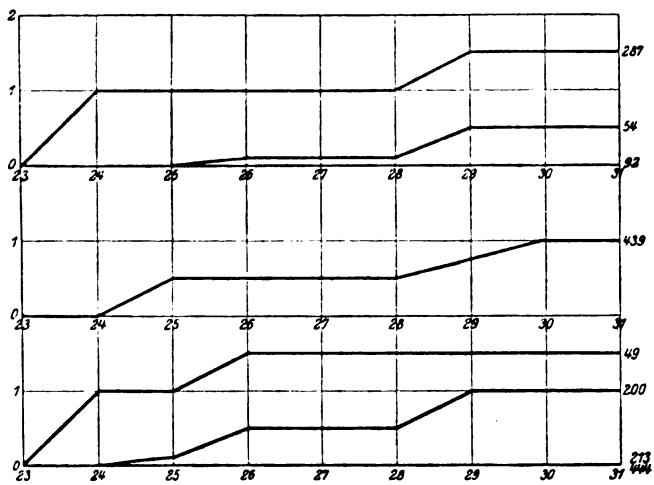


Fig. 8.

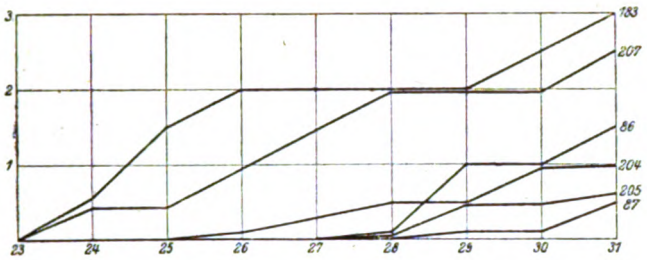


Fig. 9.

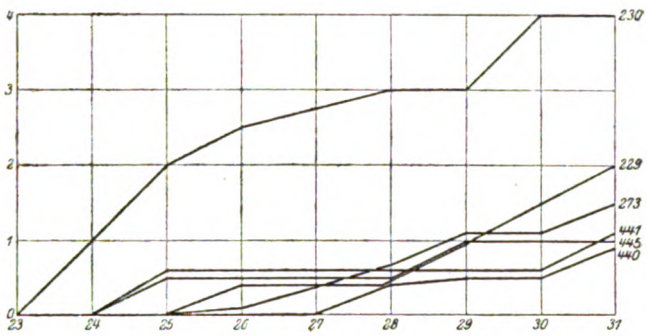


Fig. 10.

Tabelle XI.

Benzopurpurinreihe [11 Tage alte Farbstofflösungen].

Klasse	Diffusionsgeschwindigkeit in mm	Nach 8 Tagen Farbstoff Nr.	Nach 13 Tagen Farbstoff Nr.
1	0	92. 213. 444	92. 213. 444.
2	0—1	54. 87. 205	
3	1	439. 200. 204. 445 440. 441	54. 439. 200. 87. 205 445. 440. 441
4	1—2	287. 86. 273	287. 86. 204
5	2	229	273
6	2—3	207	229
7	3	183	
8	3—4		
9	4	230	207
10	4—5		183
11	5		
12	5—6		230
13	6		

Tabelle

Benzopurpurinreihe

Diffusion in 2%iger Gelatinelösung,

Dat.	54	287	92	52	201	288	438	53	202	289	439	203	213	200	444
21. XI.	—	Sp.	—	—	—	0,5?	—	0,5	0,5	—	—	—	—	—	0,5
22.	0,5	0,5	—	0,5	—	—	—	0,5	0,5	—	—	—	—	—	0,5
23.	1	0,5—1	0,5	0,5	0,5	—	—	1	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5
24.	1	0,5—1	0,5	0,5	0,5	—	—	1	0,5	—	—	—	—	—	0,5
25.	1	0,5—1	0,5—1	0,5	0,5	0,5	—	1	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5
26.	1	0,5—1	0,5—1	0,5	0,5	0,5	—	1	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5
27.	1	0,5—1	0,5—1	0,5	0,5	0,5	—	1	0,5	0,5	—	—	—	—	0,5
28.	1	1	<1	0,5	0,5	0,5	—	1	1	0,5	0,5	—	Sp.	—	0,5
29. XI.	1	1	<1	0,5	0,5	0,5	—	1	1	0,5	—	—	Sp.	—	0,5
30.	1	1	<1	0,5	0,5	0,5	—	1	0,5	0,5	—	—	„	—	0,5
2. XII.	1	1	<1	0,5	0,5	0,5	—	1	0,5	0,5	—	—	0,5	—	0,5
3.	1	1	<1	0,5	1	1	—	1	1	0,5	—	—	0,5	—	1
4.	1	1	1	0,5	1	1	—	1	0,5	0,5	—	—	0,5	—	1
5.	1,5	1	1	—	1	1	—	1	1	0,5	—	—	0,5	—	1
6.	1,5	1	1	—	1	1	—	1	1	0,5	und.	—	0,5—1	—	1
7.	1,5	1	1	—	1	und.	—	1	und.	0,5	Bakterien-Entwicklg.	0,5	0,5—1	—	1,5
9.	1,5	1	1,5		1			1		0,5		0,5	1	—	1,5
11.	<2	1	1,5		1		—	1		—		0,5	1	—	1,5

Verwendet wurden 0,1%ige Lösungen (dargestellt am 12. X. 1912); lösten sich die Farb-

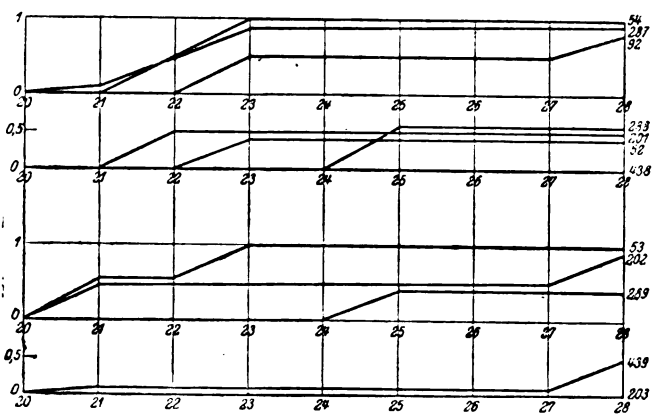


Fig. 11.

XII.

[39 Tage alte Farbstofflösungen].

begonnen am 20. November 1912.

87	86	206	208	207	183	204	205	445	322	229	230	440	441	442	273
—	—	—	—	Sp.	1	0,5	—	—	—	0,5	1	—	—	0,5	—
—	—	—	Sp.	0,5	2	0,5	—	—	—	1	2	—	—	0,5	0,5
—	—	—	„	1	3	0,5	—	—	—	1,5	3	Sp.	—	0,5	1
—	—	—	„	1,5	3,5	0,5	—	—	0,5	1,5	3	0,5	—	0,5	1
—	—	—	0,5	2	>4	0,5	—	—	0,5	2	3,5	0,5	—	0,5	1
—	—	—	0,5	2,5	4	0,5	—	0,5	0,5	2,5	4	0,5	—	0,5	1,5
—	—	—	0,5	2,5	4,5	0,5	—	0,5	0,5	3	4	0,5	—	0,5	1,5
—	—	—	0,5	3	5	0,5	—	0,5	0,5	3	4	0,5	—	0,5	1,5
—	0,5	—	0,5	3	5	0,5	—	0,5	—	3	5	0,5	—	0,5	1,5
—	0,5	—	0,5	3	6	0,5	—	0,5	—	3	5	0,5	—	0,5	<2
—	0,5	—	0,5	3,5	6	1	—	0,5	0,5	3	6	0,5	—	0,5	2
—	1	—	0,5	3,5	und.	1	1	1	0,5	3,5	6	1	—	0,5	2
—	1	—	0,5	4		0,5	—	1	0,5	4	und.	1	—	0,5	2,5
0,5	1	—	0,5	4		1	—	1	0,5	4	„	1	—	0,5	2,5
0,5	1	—	1	4		1	—	1	0,5	4		1	—	0,5	2,5
1	1,5	0,5	1	5		1	—	1	0,5	4,5		1	—	1	2,5
fraglich. Bakterienentwicklg.	1,5	0,5	1	5		1	—	1	0,5	4,5		1	—	1	<3
	1,5	0,5	1	5		1	—	1	—	5		1,5	—	1	3

stoffe nicht vollständig auf, so wurde die 0.1 %ige Suspension **zum Versuche benutzt.**

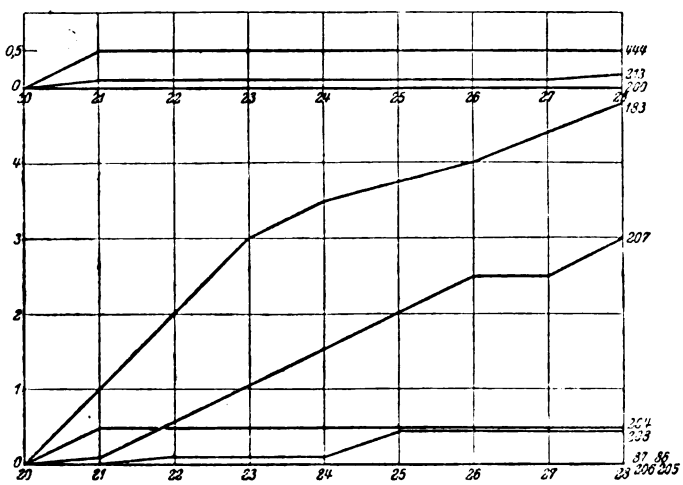


Fig. 12.

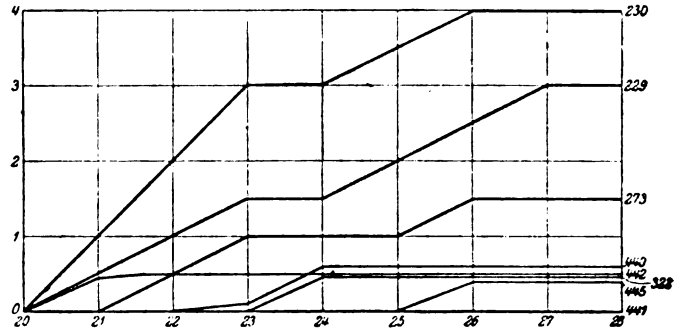


Fig. 13.

Tabelle XIII.

Benzopurpurinreihe [39 Tage alte Farbstofflösungen].

Klasse	Diffusionsgeschwindigkeit in mm	Nach 8 Tagen Farbstoff Nr.	Nach 13 Tagen Farbstoff Nr.
1	0	438. 203. 439. 213. 200 87. 86. 206. 205. 441	438. 439. 203. 200 87. 206. 205. 441
2	0—1	92. 52. 201. 288. 289. 444 208. 204. 445. 322. 440. 442	92. 52. 289. 213 208. 322. 442
3	1	54. 287. 53. 202	54. 287. 201. 288. 53. 202 444. 86. 204. 445. 440
4	1—2	273	
5	2		273
6	2—3		
7	3	207. 229	
8	3—4		207. 229
9	4	230	
10	4—5		
	5	183	
	6		183. 230

Diese Tatsache prägt sich auch ganz scharf im physikalischen Versuch aus. Die Tabellen X bis XIII geben die Diffusionsgeschwindigkeit der Benzopurpurinfarbstoffe in 11 Tage und 39 Tage alter Lösung an.

Die Diffusionsgeschwindigkeit wird mit wachsendem Alter geringer und wird bei solchen Farbstoffen, die wir im Tierversuch bereits als besonders labil kennen gelernt hatten, sogar zu Null. Im ganzen ist also mit zunehmendem Alter ein Abwandern in die niedrigeren Klassen zu den Nichtvitalfarbstoffen verbunden. Es findet sich also auch hier eine völlige Über

einstimmung zwischen den Ergebnissen des physikalischen und des Tierversuches.

γ) Agar-Agar-Gel.

Zur Vollständigkeit sei erwähnt, daß auch versucht wurde, in einem 0,5 %igen Agar-Agar-Gel die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe dieser Reihe zu bestimmen. Die Diffusion ging bei den diffusionsfähigen Farbstoffen erheblich rascher als im 2 %igen Gelatinegel von statten. Doch wurde die Grenzzone meist schon nach einem Tage so undeutlich, daß nur schätzungsweise Ablesung möglich war. Ich sehe daher von der Mitteilung dieser Versuchsreihe ab. Im großen und ganzen ergaben sich Resultate, die mit dem Gelatineversuche Übereinstimmung zeigten. Der Wert der Versuche ist aber durch die große Ungenauigkeit ein recht beschränkter.

Tabelle XIV.

Harnstoffarbenreihe.

Diffusion in 2 %igem Gelatinegel, begonnen am 17. November 1912.

Dat.	258	189	185[1]	244	245	188	170[1]	171	169	246	247[1]
18. XI.	Sp.	1	—	2	0,5	1	—	—	Sp.	1	—
19.	0,5	2	0,5	4	1	2	0,5	0,5	0,5	2	1
20.	1	2,5	1,5	5	1,5	2	0,5	0,5	1	2,5	2
21.	1	3	2	und.	2	2	1	0,5	1,5	3	3
22.	1	3	2,5		2,5	2,5	1,5	0,5	2	3,5	4
23.	1	4	3		3	3	2	0,5—1	2	4	5
24.	1	4,5	4	und.	3	3	2,5	1	2	4	5
25.	1	5	4	und.	3	4	3	1	2	5	6
26.	1	5	4		3,5	4	3	1	2,5	5	6,5
27.	1	5	4,5		3,5	4,5	3,5	1	2,5	5	und.
28.	1	5	4,5		4	4,5	und.	1,5	3	5,5	
30.	1	5	5		4	5	und.	1,5	3	6	
2. XII.	1	6	und.		und.	5	und.	1,5	3	6	und.
3.	1,5	und.				und.		und.	3	6,5	

Verwendet wurden frische 0,1 %ige Farbstofflösungen.

[1]) Skala erst am 18. XI. angesetzt. Ablesung also erst am 19. XI. begonnen. d. = diffus; und. = undeutlich.

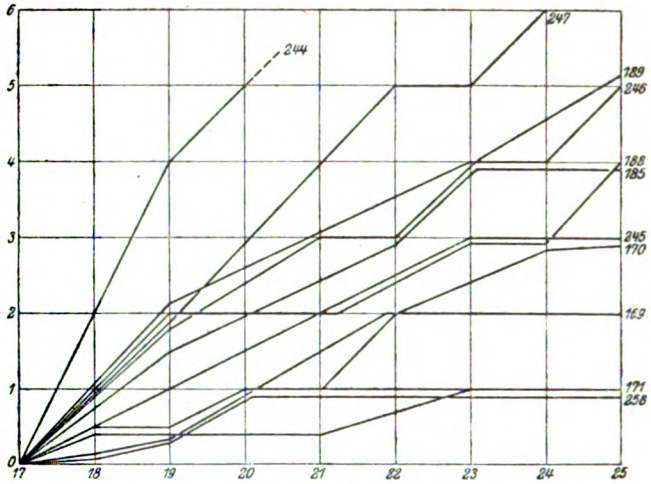
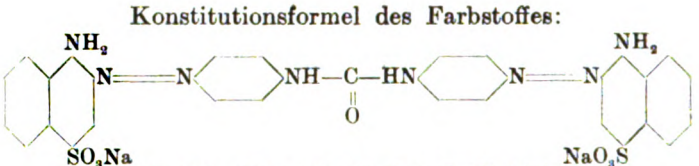


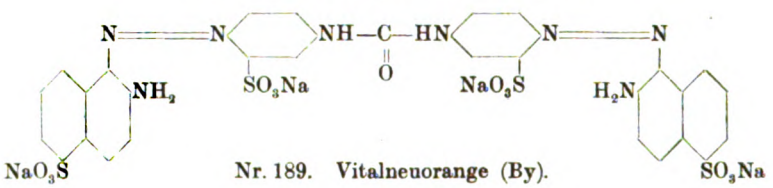
Fig. 14.

Tabelle XV.

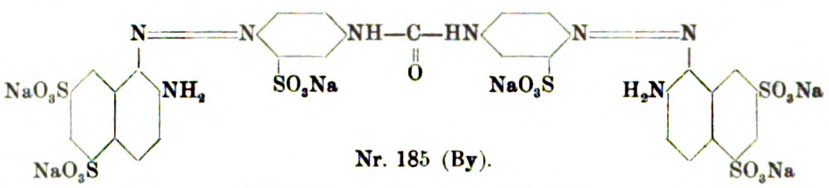
Konstitutionsformel des Farbstoffes:



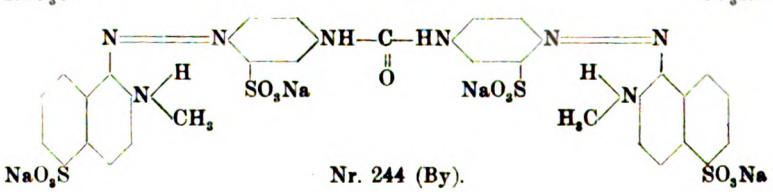
Nr. 258. Salmroth (B) [Sch. J. IV. 206].



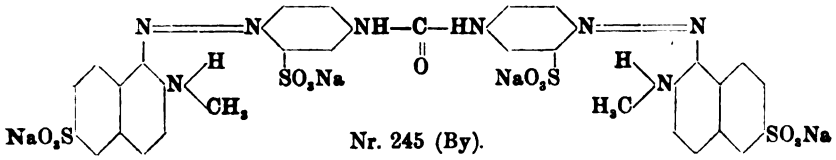
Nr. 189. Vitalneuorange (By).



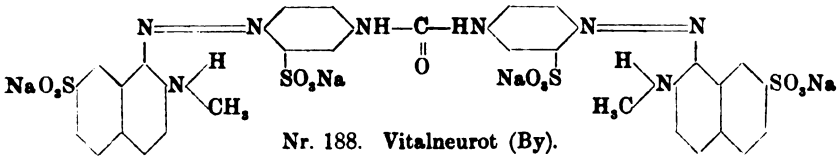
Nr. 185 (By).



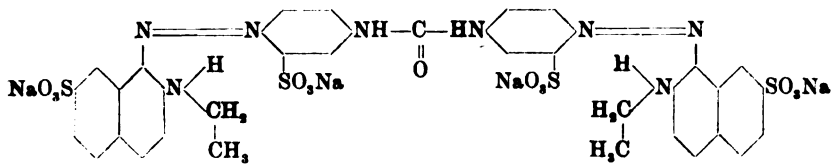
Nr. 244 (By).



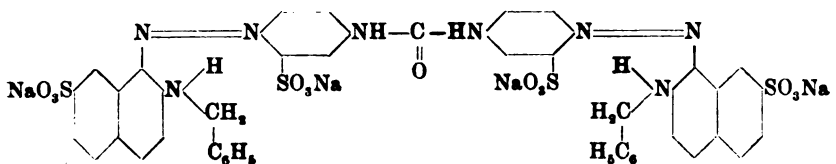
Nr. 245 (By).



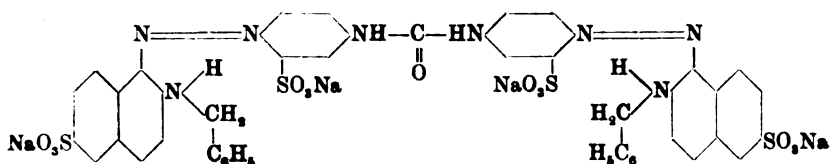
Nr. 188. Vitalneurot (By).



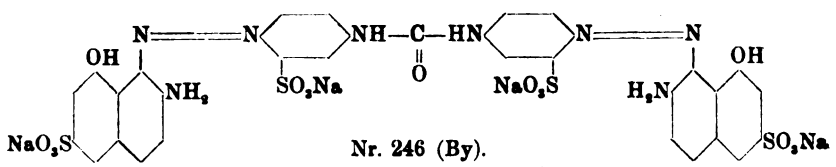
Nr. 170 (By).



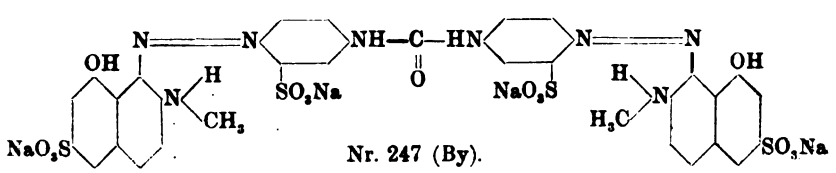
Nr. 171 (By).



Nr. 169 (By).



Nr. 246 (By).



Nr. 247 (By).

Tabelle XVI.

Harnstoffarbenreihe.

Klasse	Diffussionsgeschwindigkeit in mm	Nach 8 Tagen Farbstoff Nr.	Nach 13 Tagen Farbstoff Nr.
1	0		
2	0—1		
3	1	258. 171	258
4	1—2		171
5	2	169	
6	2—3		
7	3	245. 170	169
8	3—4		170↓
9	4	185. 188	245
10	4—5		
11	5	189 (244)↓ 246	189. 185. 188
12	5—6		
13	6		246
14	6, 5	247	
15			247. 244

d) Harnstoffarbstoffreihe.

α) Gelatinegel.

Eine weitere Reihe von Farbstoffen, die man als Derivate des Harnstoffs auffassen kann, zeigt wieder die uns nun schon wohl bekannten Gesetzmäßigkeiten. Wie früher sind in Tabelle XVI die Farbstoffe in Klassen geordnet, und dementsprechend zeigen:

Klasse 1. —
„ 2. —
„ 3. Farbstoff Nr. 258. Nur am Injektionsort lokale V.
„ „ 171. Giftig, nur lokale V.
„ 5. „ „ 169. Es tritt zunächst nur lokale V. ein, die A. bleibt sehr schwach.
„ 7. „ „ 245. Sehr gute A.
„ „ 170. Sehr gute A.
„ 9. „ „ 185. Schnelle sehr gute A.
„ „ 188. Schnelle sehr gute A.
„ 11. „ „ 189. Schnelle sehr gute A.
„ „ 244. Schnelle sehr gute A.
„ „ 246. Schnelle sehr gute A.
„ 14. „ „ 247. Schnelle sehr gute A.

Die Diffusibilität ist bei diesen Farbstoffen im allgemeinen eine höhere als in der vorigen Farbstoffreihe. Dementsprechend findet sich unter den „Harnstoffarbstoffen" eine große Zahl rasch und sehr gut allgemein vitalfärbender Farbstoffe. Die Übereinstimmung der physikalischen und biologischen Versuchsergebnisse ist für die ganze Reihe eine restlos vollkommene und bleibt es auch für 11 weitere Vertreter dieser Farbstoffreihe, die ich untersuchte, die aber hier nicht angeführt sind.

Tabelle XVII.

Harnstoffarbenreihe.

Freie Diffusion in Wasser. Angesetzt am 29. XI. 10 Uhr vorm.

Datum	Temp.	258	189	185	244	245	188	170	171	169	246	247	Cu
29. XI. vorm. 11^h	18°	1	2	2	1	1	2	0,5	—	0,5	1,5	1	2
12^h		3	< 4	3	2,5	> 2	3,5	2,5	1,5	2,5	2,5	> 2	3
„ mitt. 1^h		4	5	3,5	3	3,5	4,5	3,5	2,5	3,5	3,5	3	4
nachm. 3^h		5	7	4	5	4,5	6	5	4	4,5—5	5	5	6
4^h	19°	und.	8	4	6	6	8	6	4,5	5	6	6	8
5^h			9	4	6	7	8,5	6,5	6	6	6,5	6,5	10
6^h			< 10	4	7	8	10	6,5	6	6,5	7	7,5	11
30. XI. vorm. 10^h		ca. 14	18	11	14	14	15	15	12	14	14	14	ca. 20
2. XII. „ 10^h		ca. 22	28	23	25	24	22 d	23	23	23	26	25	ca. 35
3. „		ca. 25	29	27	27	26	und.	25	25	25	29	27	und.

Nr. 188 zeigte am 2. XII. früh eine diffuse Färbung der darüberstehenden Flüssigkeit. Nr. 169, 170 und 189 zeigten die gleiche Erscheinung in ganz geringem Maße.

Verwendet wurden 0,2%ige Lösungen vom 17. XI. Nur Nr. 258 wurde in konz. Lösung verwendet, da seine Löslichkeit nicht genügte. Verdünntere Lösungen anzuwenden war wegen der geringen Färbekraft der Substanzen nicht möglich. Cu stellt eine ammoniakalische $CuSO_4$-Lösung von 1% Cu-Gehalt als Vergleichslösung dar.

Die bei der freien Diffusion in Wasser auftretenden Konvektionsströme lassen keine klaren Ergebnisse zu.

β) Freie Diffusion.

In dieser Reihe wurde auch die freie Diffusion in Wasser geprüft. Bald werden aber auch hier die Grenzen diffus und die Ablesungen ungenau. Die Versuche sind gegen äußere Einflüsse sehr empfindlich. Auftretende Konvektionsströme lassen klare Ergebnisse nicht zu. Die Methode war also für unsere Zwecke nicht brauchbar (vgl. Tabelle XVII).

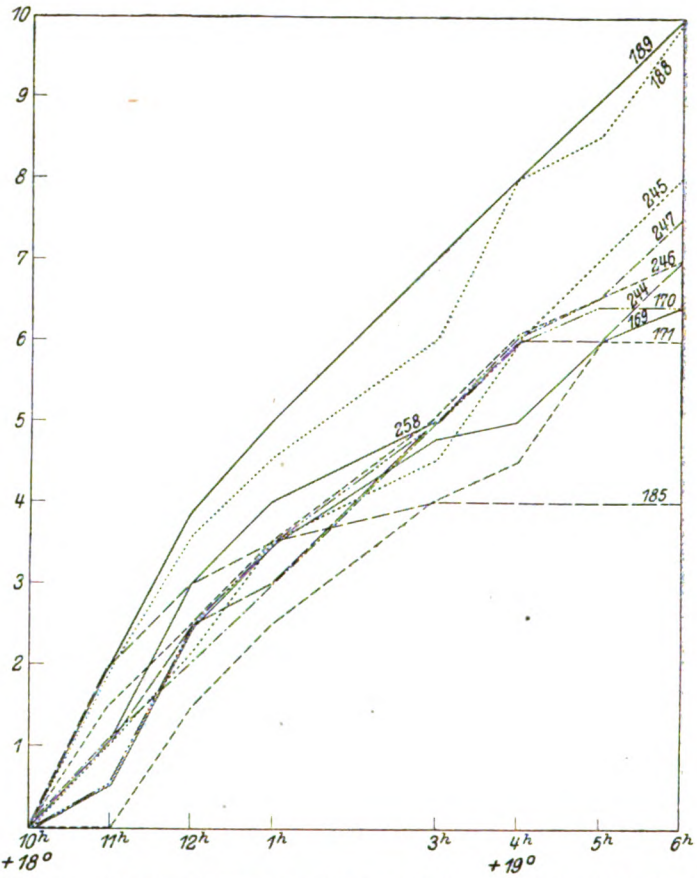


Fig. 15. Diffusionskurven der Harnstoffarben für freie Diffusion in Wasser vom 29. XI. 12.

Tabelle XVIII. Harnstoffarben.

Diffusion von frischen konzentrierten Lösungen in Wasser durch Pergamenthülsen von Schleicher und Schüll. Angesetzt am 28. XI. vorm.

Datum	258	189	189	185	244	245	188	170	171	169	246	246	247
29. XI.	–	schl. H.		–	++	–	–	–	–	–	schl. H.		–
30.	–		+	(+)	++	(+)	–	–	–	?		–	–
2. XII.	–		++	+	++	+	–	+	–	+		+	+
3.	?		++	+	++	+	?	+	(+)	+		+	+
4.	+						(+)						
8.	neues Außenwasser												
9.	–		(+)	–	++	+	–	–	–	–		+	–
10.	–		+	(+)	++	++	(+)	(+)	–	(+)		+	+
11.	–		+	(+)	++	++	(+)	+	–	(+)		+	++
12.	(+)		+	+	++	++	(+)	+	(+)	+		++	++
13.	(+)		+	+	++	++	+	+	+	+		++	++

Neue Reihe, angesetzt am 9. XII.

Datum	258	189	185	244	245	188	170	171	169	246	247
10. XII.	+	++	(+)	++	(+)	?	–	(+)	–	(+)	(+)
11	+	++	(+)	++	+	(+)	+	+	?	+	+
12	+	++	(+)	++	+	+	+	+	(+)	+	++
13	+	++	+	++	+	+	++	++	+	+	++

? = fraglich; (+) = schwach; + = mittel; ++ = stark.

γ) Pergamenthülsen.

Ebenso lieferte die Prüfung auf Diffusibilität der Farbstoffe durch Pergamenthülsen nur Näherungswerte, die im Vergleich zur Gelatinemethode aus den schon oben angeführten Gründen ungenau und obendrein subjektiv beeinflußt erscheinen (vgl. Tabelle XVIII).

e) Verschiedene Farbstoffe.

In der folgenden Tabelle XIX sind vier in der Konstitution verschiedene Säurefarbstoffe zusammengestellt, die auch wieder unseren Gesetzen gehorchen.

Tabelle XIX.

Verschiedene Farbstoffe.

Diffusion in 2%iger Gelatinelösung, begonnen am 17. XI. 1912.

Datum	233	158	237	250
18. XI.	0,5	—	8	10
19.	1,5	—	ca. 15 und.	und.
20.	2,5	—	ca. 20 und.	und.
21.	3	—		und.
22.	4	—		
23.	5	—		
24.	6	—		
25.	und.	—		
26.		—		
27.		—		
28.		—		
29.		—		
30.		—		
2. XII.		—		
9.		—		

Verwendet wurden frische 0,1%ige Lösungen; lösten sich die Farben nicht vollständig auf, so wurde die 0,1%ige Suspension benutzt.

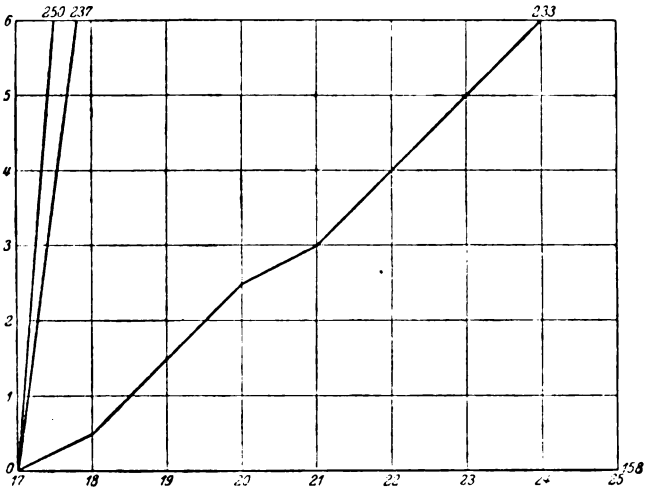
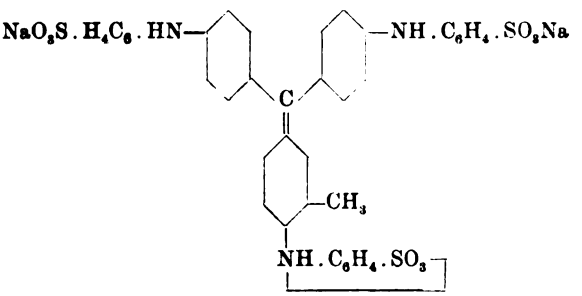
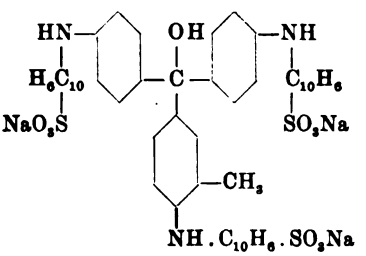


Fig. 16.

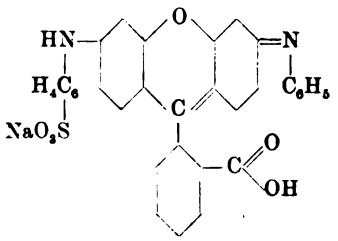
Tabelle XX.



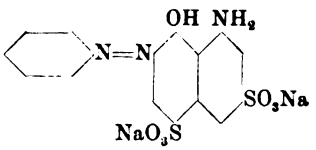
Nr. 233. Methylblau für Baumwolle (M).



Nr. 158. Isaminblau 6 B (M).



Nr. 237. Violamin Ia B (M).



Nr. 250. Tolanrot B (K).

Farbstoff Nr. 233 gibt rasche und vollständige allgemeine Vitalfärbung und zeigt mittlere Diffusionsgeschwindigkeit.

Farbstoff Nr. 158 fällt zunächst am Injektionsort aus und gibt lokale Vitalfärbung. Die ausgefallenen Farbstoffmassen gehen dann langsam wieder in Lösung und erzeugen nun erst sehr langsam eine allgemeine Vitalfärbung, die durch Speicherung des Farbstoffes in sehr feiner Granulaform in den Körperzellen repräsentiert ist. Entsprechend zeigt der Farbstoff gar kein Diffusionsvermögen. Daß er überhaupt zu allgemeiner Vitalfärbung führen kann, hat seine Ursache in der Peptisierbarkeit der Farbstoffällung. Die Abscheidung aus dem Organismus ist eine entsprechend langsame. Noch nach Monaten ist der Farbstoff im Tierkörper nachweisbar.

Farbstoff Nr. 237 gibt entsprechend seiner hohen Diffusionsgeschwindigkeit nur Vitalfärbung an den Orten höchster Konzentration — also am Injektionsort, der Bauchhöhle, und an den Ausscheidungsorganen, Leber und Niere.

Noch höher ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Farbstoff Nr. 250. Ihm kommt keinerlei Vitalfärbungsvermögen mehr zu. Maximalfärbung und Ausscheidung gehen in kürzester Zeit vor sich, Speicherung findet nicht statt.

f) Kolloide Lösungen.

Unter den kolloiden Lösungen (vgl. Tabelle XXI) zeigt nur Nr. 1004 eine ganz geringe Diffusionsgeschwindigkeit. Die

Speicherung ist eine streng lokale. Nr. 1006 war von zu großer Giftwirkung, um in Konzentrationen injizierbar zu sein, die eine sichere mikroskopische Feststellung gestatten; auch Hyrgol zeigte starke Giftwirkung. Nr. 1016 wurde biologisch nicht untersucht. Zu dieser Reihe gehört noch eine große Zahl kolloider Metallösungen, die wie Gold, Platin, Elektrargol und viele andere hier nicht genannte bei mangelnder Diffusionsfähigkeit nur lokale Vitalfärbung geben.

Tabelle XXI.

Kolloide Metalle.

Diffusion in 2%iger Gelatinelösung, begonnen am 17. XI. 1912.

Datum	1001	1007	1004	1006	1015	1016
18. XI.	1 Tag später	—	—	—	—	—
19.	—	—	—	—	—	—
20.	—	—	—	—	—	—
21.	—	—	0,5	—	—	—
22.	—	—	0,5	—	—	—
23.	—	—	0,5	—	—	—
24.	—	—	0,5	—	—	—
25.	—	—	0,5	—	—	—
26.	—	—	0,5—1	—	—	—
27.	—	—	0,5—1	—	—	—
28.	—	—	1	—	—	—
29.	—	—	1	—	—	—
30.	—	—	1	—	?	—
2. XII.	—	—	1	—	?	—
3.	—	—	1	—	?	—
9.	—	—	1	—	—	—

Verwendet wurden frische ca. 0,1%ige Lösungen.

Nr. 1001. Lysargin (K).
„ 1007. Kollargol (v. Heyden).
„ 1004. Hyrgol (v. H.).
„ 1006. Kolloid. Selen (v. H.).
„ 1015. Kolloid. Palladium n. Paal (K).
„ 1016. Kolloid. Mangan (v. H.).

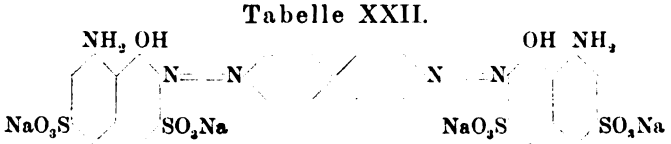
Auch die kolloiden Metallösungen zeigen demnach volle Übereinstimmung zwischen physikalischem Versuchsergebnis und Verteilungs- und Speicherungsart im tierischen Organismus.

3. Sulfonierungsgrad und Vitalfärbungsvermögen.

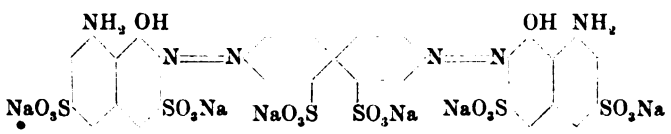
Eine experimentelle weitere Nachprüfung der so gewonnenen Ergebnisse würde sich ermöglichen lassen, wenn es gelänge, durch Änderung des Diffusionsvermögens eines Farbstoffes auch sein Vitalfärbungsvermögen zu beeinflussen. Die folgende Zusammenstellung bringt diesen Nachweis.

Ich habe bereits S. 21 dargelegt, daß die Sulfonsäuregruppen den meisten Säurefarbstoffen das Vermögen verleihen, sich in Wasser zu lösen, fügte aber hinzu, daß noch besondere Verhältnisse (Einflüsse der Konstitution) hier komplizierend wirken, so daß Löslichkeitsgrad und Zahl der Sulfonsäuregruppen nicht völlig parallel gehen. Ich komme weiter unten noch näher darauf zurück. Die konstitutionellen Einflüsse sind fast völlig ausgeschaltet, wenn wir nur Farbstoffe vergleichen, deren Konstitution absolut gleich ist, die sich nur durch die Zahl der Sulfonsäuregruppen unterscheiden.

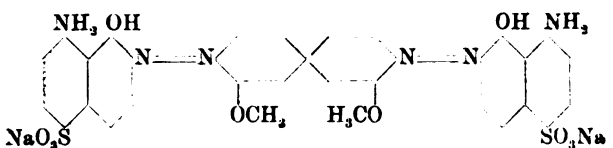
Tabelle XXII.



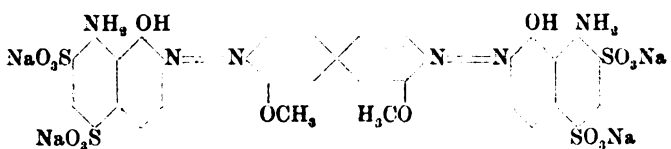
Nr. 98. Dianilblau H 2 G (M).



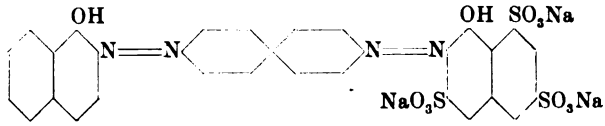
Nr. 225 (M).



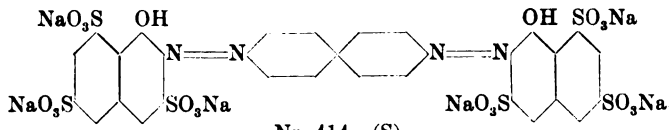
Nr. 138. Chicagoblau B (A).



Nr. 108. Dianilreinblau PH (M).

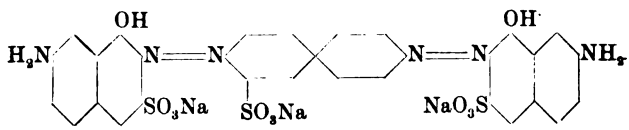


Nr. 128. Trisulfonviolett B (S).

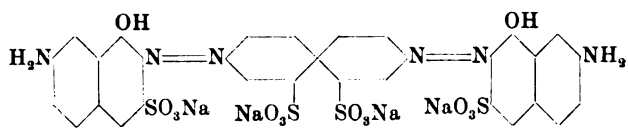


Nr. 414. (S).

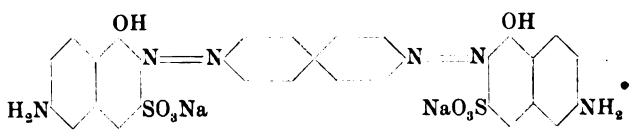
Nr. 147. Diaminschwarz RO (C).



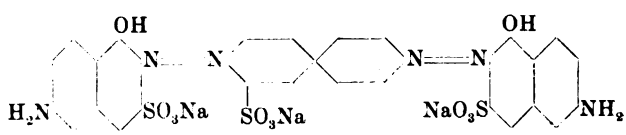
Nr. 150.



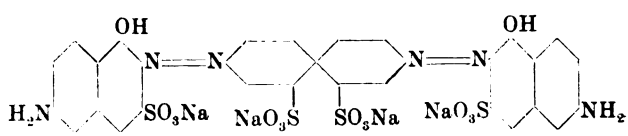
Nr. 227.



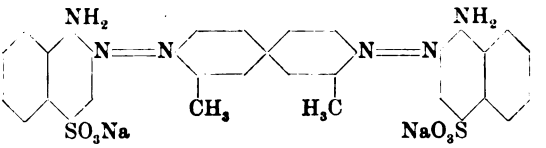
Nr. 100. Dianilviolett BE.



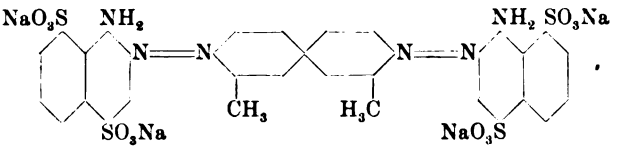
Nr. 151.



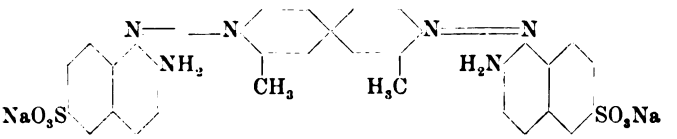
Nr. 228.



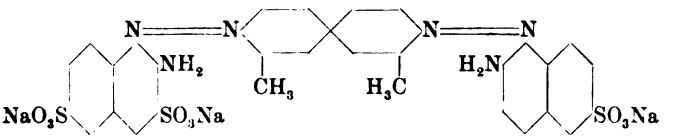
Nr. 52. Benzopurpurin 4 B (Gr. E.).



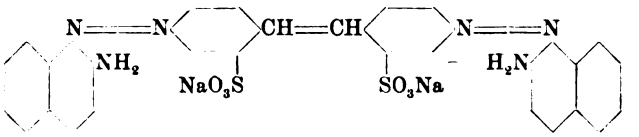
Nr. 537 (B).



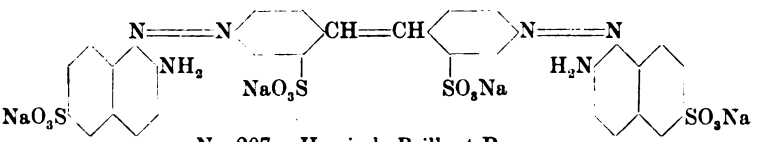
Nr. 49. Benzopurpurin B (Gr. E.).



Nr. 87. Brillantkongo R (A).



Nr. 206. Hessisch Purpur N.



Nr. 207. Hessisch Brillant-Purpur.

So haben wir in Nr. 98 (vgl. Tabelle XXII) mit vier SO_3Na-Gruppen einen guten Vitalfarbstoff vor uns. Mit der Erhöhung der Zahl auf sechs in Nr. 225 gelangen wir zu einem Farbstoff, der in 30 Minuten das Tier prachtvoll färbt und nach 24 Stunden bereits zum größten Teil wieder abgeschieden ist; auf der Höhe der Färbung kommt es zu guter Speicherung in den Zellen.

Nr. 138 gibt nur lokale Vitalfärbung. Nr. 108, der 2 Sulfonsäuregruppen mehr hat, färbt ähnlich wie Trypanblau schön vital.

Mit 3 Sulfonsäuregruppen färbt Nr. 128 schön allgemein vital, während Nr. 414 mit 6 solchen Gruppen sehr rasch aufgenommen und abgeschieden wird und nur in mäßigem Umfang zur Speicherung kommt.

Nr. 147 mit 2 Sulfonsäuregruppen gibt zunächst nur Vitalfärbung am Injektionsort und seiner nächsten Umgebung. Erst nach vielen Injektionen ist schwächste Allgemeinfärbung nachzuweisen. Nr. 150 mit 3 Sulfonsäuregruppen färbt gut allgemein vital, während Nr. 227 mit 4 solchen Gruppen rasche gute Allgemeinfärbung gibt.

Denselben Unterschieden im Vitalfärbungsvermögen begegnen wir bei den folgenden 3 Farbstoffen Nr. 100 mit 2, Nr. 151 mit 3 und Nr. 228 mit 4 Sulfonsäuregruppen.

Der nur 2 Sulfonsäuregruppen enthaltende Farbstoff Nr. 52 färbt nur lokal vital. Durch Einführung von 2 weiteren Sulfonsäuregruppen gelangen wir in Nr. 537 zu einem vorzüglichen allgemeinen Vitalfarbstoff.

Das uns schon bekannte mäßige Vitalfärbungsvermögen von Nr. 49 Benzopurpurin B wird durch eine dritte Sulfonsäuregruppe, die Nr. 87 enthält, ganz erheblich gebessert.

Nr. 206, mit $2\,SO_3Na$, gibt nur lokale und erst nach vielen Injektionen allerschwächste allgemeine Vitalfärbung, während Nr. 207, mit $4\,SO_3Na$, ein guter allgemeiner Vitalfarbstoff ist.

In einer sehr großen Zahl noch anderer Versuche findet sich ganz die gleiche Parallelität zwischen Sulfonierungsgrad und Vitalfärbungsvermögen, doch mögen die hier angeführten Beispiele genügen.

Zusammenfassung.

Bei der experimentellen Untersuchung des biologischen Verhaltens saurer Farbstoffe stellte sich heraus, daß die Ehrlichsche Seitenkettentheorie zur Erklärung der beobachteten Tatsachen völlig versagte:

„Farbstoffe mit den heterogensten Receptoren und der verschiedensten chemischen Konstitution verhielten sich biologisch gleich, während viele Farbstoffe mit gleichen Receptoren sich biologisch verschieden verhielten."

Ebenso ließ die theoretische Betrachtung der Ehrlichschen Theorie unter Heranziehung der Theorie der Farbstoffe die Seitenkettentheorie für die Farbstoffe unanwendbar erscheinen.

Chemische Reaktionen zwischen Zelle und Farbstoff können also nicht die Ursache der Vitalfärbung sein.

Es besteht vielmehr eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem physiko-chemischen Verhalten der Farbstofflösungen und ihrem Vitalfärbungsvermögen.

An der Hand des experimentellen Materials läßt sich durch Vergleich der Resultate der physikalischen Versuche und der Tierversuche zeigen:

„Farbstoffe mit fehlendem oder nur sehr geringem Diffusionsvermögen geben nur Vitalfärbung am Injektionsort und seiner näheren Umgebung; die Vitalfärbung bleibt außerordentlich lange bestehen.

Mit wachsender Diffusionsgeschwindigkeit wächst das Vermögen der Farbstoffe, allgemein vital zu färben; die Allgemeinfärbung tritt langsam ein und geht langsam wieder zurück; die Speicherung bleibt mehr oder weniger lange in den Zellen bestehen.

Bei einer gewissen mittleren Diffusionsgeschwindigkeit gelangen wir zu allgemeinen Vitalfarbstoffen, die für histologische Untersuchungen besonders geeignet sind. Hier ist das Zeitverhältnis zwischen Färbung —, Speicherung —, und Entfärbung ein zu solchen Zwecken besonders günstiges.

Wird die Diffusionsgeschwindigkeit immer größer, so wird das Zeitintervall Färbung —, Speicherung —, Entfärbung immer kürzer. Die Speicherung findet zunächst noch in allen physiologisch hierzu geeigneten Zellen statt.

Bei sehr hoher Diffusionsgeschwindigkeit gehen Färbung und Entfärbung innerhalb von Stunden vor sich. Zur Speicherung kommt es zunächst nur noch an den Orten höchster Konzentration, also am Injektionsort und an den Ausscheidungsorten Leber und Niere. Schließlich kann jede Speicherung ausbleiben.

Der Farbstoff durchtränkt nur noch diffus den Organismus.

Zwischen den beiden Extremen — nicht diffundierender Farbsäuresuspension und äußerst rasch diffundierender Farbstofflösung — finden sich in feinster Abstufung alle nur denkbaren Übergänge.

Es zeigen die physikalischen Versuchsresultate ferner, weshalb sich frische oder alte, kalt oder warm bereitete, verdünnte oder konzentrierte, elektrolytarme und -reiche Lösungen des gleichen Farbstoffes biologisch verschieden verhalten können.

Die so gefundenen Gesetzmäßigkeiten konnten weiterhin bewiesen werden durch Änderung des Vitalfärbungsvermögens gleicher Farbstoffe bei Änderung ihrer Diffusionsgeschwindigkeit in wäßriger Lösung.

Es ergab sich ferner, daß die Zellreaktion des vitalgefärbten Organismus weitgehend abhängig ist vom Vitalfärbungsvermögen eines Farbstoffes und damit von seinem Diffusionsvermögen.

Ergänzt werden die Beobachtungen durch das übereinstimmende biologische Verhalten kolloider Metalllösungen mit dem von Lösungen nicht diffusibler saurer Farbstoffe.

Das biologische Verhalten saurer Farbstoffe ist demnach abhängig von ihrem physikalischen Lösungszustande.

VI. Physikalische Chemie der Farbstoffe.

1. Die Arbeiten von Hoeber, Ruhland, Küster und v. Möllendorff.

Diese letzte Feststellung, daß das biologische Verhalten saurer Farbstoffe von ihrem physiko-chemischen Verhalten abhängt, ist im Grunde nichts Neues. Von etwas anderen Gesichtspunkten aus haben Hoeber, Ruhland und Küster[1]) mehr oder weniger ähnliche Anschauungen entwickelt, in neuester Zeit endlich hat v. Möllendorff die gleiche These aufgestellt. Hoeber und Möllendorff aber berücksichtigten nur die Vitalfärbung der Niere, Ruhland und Küster die der Pflanzenzellen.

Hoeber und Ruhland gehen auf die physikalische Chemie

[1]) l. c.

der Farbstoffe näher ein, doch werden die Arbeiten Hoebers stark beeinflußt von der Idee, daß die Lipoidtheorie Overtons durchaus gültig sein müsse, während Ruhland eine Theorie aufstellt, die er meines Erachtens nicht voll beweisen kann. Ganz besonders ist bei Ruhland unklar, ob er unter Vitalfärbung nur die diffuse Durchtränkung des lebenden Zellprotoplasmas oder die Farbstoffspeicherung im Protoplasma versteht. Möllendorff endlich stützt sich auf die Arbeiten von Hoeber und Ruhland in bezug auf die physikalische Chemie und sagt einfach: „Ich verweise im übrigen auf die kolloidchemische Fachliteratur[1]). Meine Versuche stellte ich zum größten Teil ohne Kenntnis der obigen Literatur an“[2]).

Nur unter Berücksichtigung der „kolloidchemischen Fachliteratur“ aber ist es möglich, unsere Anschauungen über das Wesen der Vitalfärbung zu erweitern und zu vertiefen.

Es kann hier natürlich nicht meine Aufgabe sein, die Grundlagen der physikalischen und theoretischen Chemie darzulegen[3]).

Von Interesse für das Vitalfärbungsproblem ist die physikalische Chemie der Farbstoffe.

2. Die Arbeiten von W. Biltz.

Die Salze der hochmolekularen Farbsäuren und Farbbasen gehören nach Zsigmondy[4]) der Klasse der Semikolloide an, zu der auch die Abbauprodukte echter Kolloide, wie Dextrine und Peptone, ferner wäßrige Lösungen von Salzen hochmolekularer organischer Substanzen wie der Stearinsäure, Ölsäure usw. gehören[5]). Die Semikolloide bilden eine Klasse der reversiblen Kolloide, und stehen nach ihren Eigenschaften in Mittelstellung zwischen Kol-

[1]) l. c. S. 223.

[2]) ibid.

[3]) cf. Herz, Leitf. d. theoret. Chemie, Stuttgart 1912. — Nernst, Theoret. Chemie, Stuttgart 1913. — Zsigmondy, Kolloidchemie, Leipzig 1912. — Ostwald, Grundr. d. Kolloidchemie, Leipzig 1911. — Freundlich, Capillarchemie, Leipzig 1909. — Hoeber, Physik. Chemie d. Zelle, Leipzig 1911.

[4]) l. c.

[5]) Zsigmondy, S. 23.

loiden und Krystalloiden[1]). Lösungen dieser Körper zeigen also teils Eigenschaften krystalloider, teils solche kolloider Lösungen.

Die Zahl der Arbeiten, die sich mit der Untersuchung des Lösungszustandes der Farbstoffe beschäftigen, ist eine recht große. Auffallend sind die oft ganz entgegengesetzten oder wenigstens stark voneinander abweichenden Versuchsresultate der einzelnen Forscher. Der Grund hierfür liegt in der Zwitternatur des Objektes und erst die weitausschauenden grundlegenden Arbeiten von W. Biltz festigen diese Erkenntnis und erklären die Widersprüche.

Biltz[2]) zeigt zunächst, daß eine Substanz nicht nur dann Kolloidcharakter aufweist, wenn sie in Lösung der Dialyse unfähige große Aggregate kleiner Moleküle bildet, sondern wenn auch in monomolekularer Lösung die eigene Molekulargröße ein Passieren der Membran verhindert, ohne daß Polymerisation notwendig ist. Unter der — wie ich aber glaube unter den eingehaltenen Bedingungen nicht stets zutreffenden — Voraussetzung, daß in den angewendeten Lösungen die Farbstoffe monomolekular gelöst sind, stellte Biltz Versuche über Membrandialyse der Farbstoffe zusammen. Hierbei ergab sich, daß die Molekulargröße — definiert durch die Zahl der Atome im Molekül — maßgebend für die Dialysierbarkeit ist:

„Beträgt die Anzahl der Atome in einem Farbstoffmolekül ca. 45, so dialysiert der Farbstoff rasch, bei einem Gehalt über 45 Atomen tritt eine geringe Verlangsamung ein; die Farbstoffe zwischen den Atomzahlen von ca. 55 bis 70 dialysieren nur wenig oder gar nicht; bei über 70 Atomen hört die Dialysierbarkeit auf."

Die hohe Molekulargröße genügt also schon, den Durchtritt durch die Membran zu verhindern, daneben aber neigen gerade Farbstoffe mit großem Molekül auch noch besonders zur Polymerisation, was erst recht die Dialysierbarkeit aufhebt. Sowohl wachsende Molekulargröße, wie auch Polymerisation leiten mehr und mehr vom Krystalloid- zum Kolloidzustand über.

[1]) Zsigmondy, S. 22.

[2]) Biltz und Pfenning. Gedenkboek van Bemmelen 1910.

Neben diesen additiven Eigenschaften sind konstitutive von größtem Einfluß auf die Dialysierbarkeit der Farbstoffe.

„Vor allem ist es der Einfluß der Sulfonsäuregruppen, der ähnlich, wie er die Löslichkeit der Farbstoffe verbessert, sehr deutlich verstärkend auf die Dialysierbarkeit wirkt."

Farbstoffe, die ihrer Atomzahl nach zu den nicht dialysierbaren gehören, zeigen nach Eintritt von Sulfonsäuregruppen mehr oder weniger rasche Dialyse. Dabei wirkt der Eintritt der ersten Sulfonsäuregruppe am meisten begünstigend auf die Dialysierbarkeit. Der weitere Eintritt von Sulfonsäuregruppen wirkt im gleichen Sinne, doch mit zunehmender Zahl in immer geringerem Grade.

„Benachteiligend auf die Dialysierbarkeit scheint die Alizarinkonstitution zu wirken.

Biltz weist darauf hin, daß hier ähnliche Verhältnisse vorliegen wie sie Oeholm[1]) und Bredig[2]) feststellen. Oeholm zeigt für die freie Diffusion in Wasser gelöster Stoffe, daß eine quantitative Beziehung zwischen der Diffusionskonstante und der Molekulargröße verwandter Stoffe besteht, daß wachsende Molekulargröße der Verteilung der Moleküle im Lösungsmittel hindernd im Wege steht. Nach Bredig sinkt die elektrolytische Beweglichkeit organischer Ionen mit wachsender Atomzahl zuerst schnell, später verändert ein weiteres Wachsen der Molekulargröße die Beweglichkeit nur wenig. Auch hier wirkt die Sulfonsäuregruppe stark beschleunigend.

Von exakteren Versuchen, namentlich von Untersuchungen über freie Diffusion erwartet Biltz genauere Ergebnisse.

Die weiteren Untersuchungen von Biltz zeigen, daß Farbstoffe mit kleinem Molekül sich wie Elektrolyte, solche mit großem Molekül sich wie Kolloide verhalten, wobei alle Übergänge zwischen beiden Gruppen bestehen. Konstitutive Einflüsse — namentlich der Sulfonsäuregruppe — überlagern die additiven. Wachsende Molekulargröße wie auch zunehmende Aggregation von Einzelmolekülen gehen Hand in Hand, aber jede dieser Bedingungen allein genügt auch schon, den krystalloiden Charakter

[1]) Oeholm, Zeitschr. f. physikal. Chem. **70**, 378, 1910.

[2]) Bredig, ibid. **13**, 191, 1894.

einer Farbstofflösung mehr und mehr dem kolloiden Zustand zuzutreiben.

Von größtem Einfluß auf das physiko-chemische Verhalten von Farbstofflösungen sind außer den genannten „inneren" noch viele „äußere" Bedingungen.

Wieder sind es Arbeiten von Biltz[1]), die dies darlegen. Farbstoffe mit höherer Molekulargröße neigen schon an sich zur Bildung von Molekularaggregaten. Unter dem assoziierenden Einfluß von Elektrolytzusatz, der Temperatur, der Zeit, der Konzentration usw. können mehr und mehr Molekülaggregate gebildet werden und damit sukzessive eine Elektrolyt- zur Kolloidlösung werden.

Nach einer Besprechung der osmotischen Methodik teilt Biltz[1]) die Ergebnisse von Messungen des osmotischen Druckes elektrolythaltiger Kolloidlösungen mit; er zeigt, daß die Gegenwart von Elektrolyten die Resultate sehr stark beeinflußt.

In zwei weiteren Mitteilungen geht Biltz[2]) diesen Tatsachen ins einzelne nach und kommt auf Grund neuer Versuche zu folgenden für die physikalische Chemie der Farbstofflösungen äußerst wichtigen Anschauungen:

Reines Kongorot gibt in verdünnter Lösung gegen reines Außenwasser einen annähernd dem einfachen Mol.-Gew. entsprechenden osmotischen Druck, bei gleichleitendem Außenwasser entspricht der osmotische Druck dem dreifachen Mol.-Gew. In konzentrierten Lösungen deutet das Wachstum des Assoziationsfaktors $\left(\frac{\text{gef. Mol.-Gew.}}{\text{ber. Mol.-Gew.}}\right)$ auf beginnende Polymerisation hin.

Nachtblau zeigt neben Dissoziation noch Hydrolyse.

Elektrolytzusatz zu Kongorot- und Benzopurpurinlösungen erhöht den Assoziationsfaktor. Gleichzeitig tritt mit der fortschreitenden Polymerisation bei ultramikroskopischer Untersuchung zunächst das Tyndall-Phänomen, dann zunehmende Bildung von Submikronen ein.

Während reine Farbstofflösungen nur wenig in ihrem Zustande durch die Zeit beeinflußt werden, zeigen fremdelektrolythaltige Lösungen zunehmende Neigung zur Polymerisation. Mit

[1]) Biltz, Zeitschr. f. physikal. Chem. **68**, 357, 1909.

[2]) Biltz und Vegesack, Zeitschr. f. physikal. Chem. **73**, 481, 1910. — Biltz und Pfenning, ibid., **77**, 91, 1911.

wachsendem Alter sinkt der osmotische Druck und steigt daher der Assoziationsfaktor. Dabei werden die vorher optisch leeren Lösungen optisch mehr und mehr auflösbar. Die Viscosität nimmt zu. Im gleichen — assoziierenden — Sinne wirkt steigende Konzentration, im entgegengesetzten steigende Temperatur sowie starke Bewegung (Schütteln) der Lösungen. Entsprechende Ergebnisse liefert die Bestimmung der Viscosität unter den gleichen Bedingungen.

Es gilt demnach das Boylesche Gesetz für Lösungen reiner Farbstoffe. In reinem Zustand sind die Farbstoffe als Elektrolyte gelöst. Unter dem Einfluß zugesetzter Fremdelektrolyte, zunehmendem Alter, steigender Konzentration usw., der Lösung zeigen die gelösten Farbstoffe mehr und mehr Neigung zur Polymerisation. Die Lösungen nehmen mehr und mehr kolloiden Charakter an.

An der Hand neuer Untersuchungen der gereinigten Säurefarbstoffe:

Orange TA extra (A.) Sch. V. Nr. 311,
Tuchrot 3 GA (A.) Sch. V. Nr. 230,
Brillantkongo R (A.) Sch. V. Nr. 370,
Kongoreinblau (A.) Sch. V. Nr. 426,
Chicagoblau 6 B (A.) Sch. V. Nr. 424

schildert Biltz den Zustand rein wäßriger Lösungen dieser Farbstoffe.

Die Farbstoffe sind Elektrolyte, die sich in einem Assoziations-, Dissoziations- und Hydrolysengleichgewicht befinden, so daß polymere Farbstoffmoleküle, Farbstoffeinzelmoleküle, Farbstoffionen, Natriumionen und die Produkte der Hydrolyse nebeneinander bestehen.

Bei den Monosulfokörpern waltet die Polymerisation und Hydrolyse vor.

Bei dem Disulfokörper hält sich Polymerisation und elektrolytische Dissoziation etwa die Wage.

Bei den Tri- und Tetrasulfokörpern waltet umgekehrt die zahlreiche Ionen liefernde Dissoziation vor.

Vergleicht man den Zustand der Assoziation unter Berücksichtigung der Zahl der lieferbaren Ionen, so

nimmt diese von dem Mono- zum Disulfofarbstoff stark, weiterhin wahrscheinlich nur wenig ab.

Die untersuchten Monosulfofarbstoffe bestehen als ultramikroskopisch weitgehend auflösbare Kolloide lediglich aus Molekülaggregaten und hydrolysierten Molekülen neben freien dialysierfähigen Elektrolyten, ohne merklich Farbstoffionen zu bilden.

Bei sämtlichen Farbstoffen wird durch Natriumsulfat das Nebeneinander von Einzelmolekülen, bzw. deren Ionen und polymeren Molekülen zugunsten der letzteren verschoben, relativ am wenigsten bei den hochsulfurierten Farbstoffen. Die Wirkung des Natriumsulfates kann sich zusammensetzen aus der elektrolytisch dissoziationshemmenden Funktion des gleichionigen Zusatzes und der kolloidchemisch ausfällenden Wirkung der Salze.

Diese Ausführungen von Biltz zeigen auch, wie nahe in ihrem physiko-chemischen Verhalten die Lösungen von sauren Farbstoffen den Seifenlösungen stehen. Auch bei den Seifen zeigen die wäßrigen Lösungen der Salze von Fettsäuren mit geringer Molekulargröße Krystalloid-Eigenschaften. Mit wachsender Molekulargröße nehmen die Krystalloid-Eigenschaften ab, die Kolloid-Eigenschaften zu. Hochmolekulare Fettsäuresalze zeigen endlich typischen Kolloid-Charakter.

Die Arbeiten von Biltz lehren uns ferner, die Differenzen zwischen den Versuchsresultaten verschiedener Forscher verstehen, sie gestatten uns ein Urteil über den Wert der früheren kolloidchemischen Arbeiten für das Vitalfärbungsproblem.

Die größte Zahl der kolloidchemischen Farbstoffarbeiten hat Biltz bereits in seinen Arbeiten berücksichtigt, so daß darauf verwiesen werden kann. Hier seien nur die Arbeiten hervorgehoben, die von besonderem Interesse für das Vitalfärbungsproblem sind.

In früheren Arbeiten ist meist das Ultramikroskop zur Beurteilung des Lösungszustandes der Farbstoffe herangezogen worden.

3. Die Arbeiten von Raehlmann und Michaelis.

Nachdem Raehlmann[1]) Ultramikronen in Farbstofflösungen nachgewiesen hatte, teilt Michaelis[2]) die Farbstoffe nach ihrem ultramikroskopischen Verhalten ein in

1. ultramikroskopisch total auflösbare,
2. partiell auflösbare,
3. optisch leere

Lösungen liefernde.

Die Einteilung berücksichtigt nicht, daß je nach den obwaltenden Bedingungen, unter denen die Lösungen hergestellt werden und sich gerade befinden, ein Farbstoff allen drei Klassen angehören kann.

4. Die Arbeiten von Hoeber.

Genau das Gleiche gilt von den ultramikroskopischen Untersuchungen von Hoeber[3]), der aber seine Ergebnisse bereits durch Dialysierversuche kontrolliert. Die Elektrolytfällung kann gleichfalls nicht stets zu brauchbaren Resultaten führen, da die Elektrolytempfindlichkeit eine verschiedene sein muß, je nach dem gerade herrschenden Lösungszustande der Farbstoffe.

Daß die Diffusion durch Membranen nur Näherungswerte liefert und feinere Unterschiede nicht aufdeckt, hat Biltz bereits angedeutet.

5. Kritik unserer physikochemischen Versuche.

Da die freie Diffusion in den für uns nötigen Massenversuchen unter den von uns angewendeten Bedingungen brauchbare Resultate nicht geliefert hatte, untersuchten wir das Verhalten der Farbstoffe in Gelatinegallerten. Es ist notwendig, nun dieses Verfahren kritisch zu betrachten.

Graham hat bereits festgestellt, daß eine gelatinierte Lösung nichts mehr von einem zweiten Kolloid aufzunehmen vermag,

---

[1]) Raehlmann, Physikal. Zeitschr. **4**, 884, 1903.

[2]) Michaelis, Deutsche med. Wochenschr. **1904**, 1534. — Derselbe Virchows Archiv **179**, 195, 1905.

[3]) Hoeber und Kempner, Diese Zeitschr. **11**, 105, 1908 und l. c. S. 29 dieser Arbeit.

indem sie dessen Diffusion fast gänzlich verhindert[1]), während sie der Diffusion von Krystalloiden nur einen sehr geringen Widerstand entgegensetzt. Nach neueren Untersuchungen gilt dies jedoch nur von dünneren Gallerten, konzentriertere hingegen verlangsamen die Diffusion beträchtlich, wie Nell, ferner Bechhold und Ziegler gezeigt haben[2]). Im allgemeinen ist die Diffusion in Gallerten recht verwickelter Natur, da allerlei Einflüsse, wie Porenweite, Größe der Ultramikronen, Adsorption, elektrische Ladung und Umladung eine Rolle spielen[3]).

Wir verwendeten ein $2\,^0/_0$iges, also dünnes Gelatinegel, in dem Krystalloide rasch diffundieren. Die in den Farbstofflösungen vorhandenen Fremdelektrolyte werden also in verhältnismäßig kurzer Zeit in die über die gefärbte Gelatine geschichtete elektrolytfreie Gelatine diffundieren, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Die Versuche mit kolloiden Metallösungen zeigen, daß Kolloidlösungen dieses Dispersionsgrades im Gelatinegel nicht diffundieren. Mithin kann angenommen werden, daß Farbstofflösungen des gleichen Dispersionsgrades auch keine Diffusion zeigen werden.

Wie die früher erwähnten Versuche von Biltz zeigten, enthalten die Farbstofflösungen nebeneinander:

Polymere Farbstoffmoleküle,
Farbstoffeinzelmoleküle,
Farbstoffionen,
Natriumionen und die
Produkte der Hydrolyse.

Zur Diffusion im Gelatinegel werden die polymeren Farbstoffmoleküle nicht geeignet sein, wie auch diejenigen Farbstoffeinzelmoleküle, deren Molekulargröße hoch ist. Wo die Grenze zwischen dialysierfähiger und -unfähiger Molekulargröße in unseren Versuchen liegt, ist nicht zu sagen. Vielleicht gibt die Heranziehung der Bechholdschen Arbeiten über Ultrafiltration unter Berücksichtigung der „Porenwerte" der angewendeten Gele ein Resultat.

Wir haben in unseren Versuchen demnach die Dif-

---

[1]) Nernst, Theoret. Chem S. 455.
[2]) Zsigmondy, Koll. Chem. S. 256.
[3]) Zsigmondy, l. c. S. 257.

fusionsgeschwindigkeit kleiner diffusionsfähiger Farbstoffeinzelmoleküle und Farbstoffionen gemessen, wenn wir hier von den Produkten der Hydrolyse der Farbstoffe absehen.

Die Methode selbst ist ähnlichen Fehlern wie die Membrandiffusion unterworfen, sie gestattet aber — wie die Resultate zeigen —, viel feinere Unterschiede im physikalischen Verhalten der Farbstofflösungen zu erkennen. Gleichzeitig erhalten wir ein gewisses Maß für die Menge der diffusionsfähigen Anteile in den Farbstofflösungen, und einen Einblick in die Neigung der Farbstoffe, Molekülaggregate zu bilden, d. h. in den kolloiden Zustand überzugehen.

Diese Schlußfolgerungen scheinen uns um so eher berechtigt, als auch unsere Versuche zum Ausdruck bringen, wie weit die Diffusionsfähigkeit abhängt einmal von „inneren" Bedingungen (Farbstoffmolekülgröße, Einfluß der Sulfonsäuregruppen), dann aber auch von „äußeren" Bedingungen (Fremdelektrolytgehalt, Einfluß der Zeit, der Vorgeschichte der Lösungen usw.).

Die gewählte Versuchsanordnung scheint gerade zu vergleichenden Untersuchungen über das physikalische und biologische Verhalten der Farbstofflösungen besonders günstig.

Im physikalischen Versuch befindet sich Farbstoff + Fremdelektrolyt in einem kolloiden Medium. Die rasche Diffusibilität der Elektrolyte in einem Gel führt rasch zu einer Verdünnung der Elektrolytkonzentration im gefärbten Gel, bis bezüglich der Elektrolytkonzentration im ganzen System Gleichgewicht herrscht. So wird der assoziierende Einfluß der Fremdelektrolyte im physikalischen Versuch vermindert, und die Diffusion der Farbstoffe kommt klarer zum Ausdruck.

Im biologischen Versuch gelangt Farbstoff + Fremdelektrolyt gleichfalls in ein kolloides Medium, das hier aber bereits seinerseits elektrolythaltig ist. Wie Physiologie und Pharmakologie lehren, werden auch im Tierkörper die injizierten Elektrolyte rasch resorbiert. Diese Resorption der injizierten Elektrolyte ist aber von einer raschen Abscheidung gefolgt — besonders durch die Nierensekretion.

Im Tierversuch werden also die Fremdelektrolyte rasch aus der Farbstofflösung entfernt, doch bleibt der Farbstoff auch

hier in einer elektrolythaltigen Kolloidumgebung, da ja die tierischen Gewebe und Gewebsflüssigkeiten stets elektrolythaltig sind.

Noch näher der Wirklichkeit werden vielleicht Versuche kommen, welche die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffe im Blutserum messen. Die Versuche waren beabsichtigt, konnten aber nicht mehr ausgeführt werden.

6. Schlußfolgerungen.

Ich komme unter Berücksichtigung aller dieser Arbeiten zu folgenden Schlüssen:

Die Farbstoffe sind Elektrolyte. Je nach ihrer Molekulargröße, je nach ihrer Neigung, Molekülaggregate zu bilden, sowie nach den Lösungsbedingungen zeigen die Farbstofflösungen mehr oder weniger Neigung, aus dem Krystalloid- in den Kolloidzustand überzugehen.

Einen Maßstab für dieses Verhalten der einzelnen Farbstoffe geben die Versuche über Membrandiffusion, die Messung der osmotischen Drucke, wie sie Biltz ausführte, sowie die Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit im Gelatinegel, wie wir darlegen konnten.

Die im physikalischen Versuche gefundenen Tatsachen kommen im Tierversuch in jeder Hinsicht zum Ausdruck.

Wesentlich aber ist es, bei den Tierversuchen auseinander zu halten:

1. die Fähigkeit der Farbstofflösungen, den Tierkörper allgemein diffus zu durchtränken,

2. die Speicherung der Farbstoffe in den Zellen.

Über den ersten Punkt geben die bisherigen Versuche Aufschluß, während sie uns über den zweiten Punkt zunächst im Unklaren lassen.

So können zunächst nur folgende Schlüsse Berechtigung haben:

Je kleiner ein Farbstoffmolekül ist, je mehr es seine Konstitution zur Dialyse befähigt, je weniger der Farbstoff zur Molekülaggregatbildung neigt, je weniger sinkende Temperatur, zunehmendes Alter, steigende Konzentration, vermehrter Zusatz von Fremdelektrolyten die Dissoziation zurückzudrängen und die

Assoziation zu fördern vermögen, um so schneller wird ein Farbstoff diffundieren, um so schneller auch diffus die tierischen Gewebe durchtränken, um so schneller auch wird er vom Tier wieder ausgeschieden. Solche Farbstoffe verhalten sich wie Elektrolyte.

Je größer hingegen ein Farbstoffmolekül ist, je mehr seine Konstitution es an der Dialyse hindert, je mehr der Farbstoff zur Molekülaggregatbildung neigt, je mehr sinkende Temperatur usw. die Dissoziation zurückzudrängen und die Assoziation zu fördern vermag, um so langsamer wird der Farbstoff diffundieren, um so geringere Farbstoffmengen werden überhaupt diffusionsfähig sein, um so langsamer wird der Farbstoff die tierischen Gewebe durchtränken und um so langsamer wird er auch vom Tier wieder ausgeschieden werden. Solche Farbstoffe verhalten sich wie Semikolloide, sie zeigen in wäßriger Lösung teils Elektrolyt-, teils Kolloidcharakter.

Unter weiterer Steigerung der genannten Bedingungen gelangen wir endlich zu Farbstofflösungen, die nicht mehr zur Diffusion befähigt sind und den Charakter einer Kolloidlösung zeigen. Solche Farbstoffe bleiben am Injektionsort im tierischen Körper liegen bzw. gelangen sie nur dahin, wohin im offenen Wege die Gewebssäfte sie hintragen.

Dieser Art von Farbstoffen schließen sich zwanglos eine Reihe kolloider Metallösungen im biologischen Verhalten an.

Zwischen den beiden Endzuständen — der elektrolytischen und kolloiden Lösung — bestehen im physikalischen wie biologischen Versuch eine ununterbrochene Reihe fließender Übergänge.

Diese Gegenüberstellungen zeigen, daß nur solche Säurefarbstoffe den ganzen tierischen Körper diffus zu durchtränken vermögen, die als Elektrolyte gelöst sind. Bei Anwendung solcher Farbstoffe, die teils als Elektrolyte, teils als Kolloide gelöst sind (also der Semikolloide), vermag nur der Teil in den Tierkörper einzudringen, der Elektrolytcharakter zeigt. Da die Grenze zwischen Elektrolyt- und Kolloidzustand bei unseren

Farbstoffen unscharf ist, kann auch für den Tierversuch nicht eine scharfe Grenze festgestellt werden. Farbstoffe, die als typische Kolloide gelöst sind, vermögen nicht in den ganzen Körper einzudringen. Sie bleiben zunächst da im Tierkörper liegen, wohin sie je nach der angewendeten Injektionsart hingelangen, ohne zu diffundieren. Dem widerspricht auch keineswegs, daß nach Injektion einer hochkolloiden Farbstofflösung nach langer Zeit doch spärlichste Allgemeinfärbung auftritt. Sobald die Lösungsbedingungen am Farbstoffdepot andere werden, entstehen aus den Molekülaggregaten durch Zerfall Einzelmoleküle, die nun, wenn auch in sehr geringer Zahl, weiter durch Diffusion wandern können.

Die Allgemeinfärbung ist demnach auf die als Elektrolyte gelösten Farbstoffe beschränkt, bzw. auf den diffusionsfähigen Teil der semikolloiden Farbstofflösungen. Eine scharfe Grenze ist hier ebensowenig zu ziehen, da es nicht möglich ist, zu sagen, wo die Elektrolyteigenschaften aufhören und die Kolloideigenschaften beginnen.

VII. Natur und Genese der „Vitalfärbungsgranula".

Welches die Ursachen der Speicherung in den Zellen sind, ist aus den bisherigen Versuchen nicht ohne weiteres zu ersehen und die Beibringung neuen experimentellen Materials notwendig.

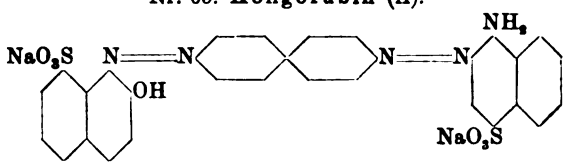
1. Metachromasie bei Säurefarbstoffen.

Die Versuche, die einen Einblick in Natur und Genese der Farbstoffgranula in den Zellen gewähren, gehen auf Beobachtungen zurück, die Evans im Sommer 1912 in Breslau machte.

Evans fand, daß nach Injektion der rein rubinroten Lösung von Kongorubin (cf. Protokoll) in die Bauchhöhle einer weißen Maus in den freien Makrophagen (Histiocyten) der Bauchhöhle wie auch in den Makrophagen des Netzes neben roten auch rein blaue Granula auftraten. Blaue neben den roten Granula fanden sich auch in den vitalfärbbaren Zellen der thorakalen Lymphdrüsen sowie in den Bindegewebszellen des Pankreas. Die übrigen Organe zeigten eine mehr oder weniger intensive reine Rotfärbung, doch waren neben roten Granulis auch blaue

nadelförmige Gebilde in den Leberzellen sichtbar. Auffallend war besonders, daß viele Zellen rote Knollen enthielten, deren Vakuolennatur durch beobachtete Brownsche Molekularbewegung in ihnen als sicher angenommen werden konnte. In solchen „Vakuolen" fanden sich blaue Einschlüsse teils in tanzender Bewegung, teils randständig.

Nr. 65. Kongorubin (A).



Weiße Maus. Je 1 ccm 0,5%ige Lösung intraperitoneal am 27. VII., 30. VII., 1. VIII. 1912.

Am 28. VII. Tier leicht rosa, 30. VII. ungefärbt.

31. VII. krank, leicht rosa, 2. VIII. rosa über und über.

Am 2. VIII. getötet, allgemein rosa.

Bauchhaut tief rot, jede Wanderzelle erfüllt von großen roten Granulis und einigen kleineren Vakuolen mit dunkleren Massen an den Rändern.

Makrophagen in der Bauchhöhle in ungeheurer Menge, die wundervolle Metrachromasie, mit blaßroten bis tiefblauen Granulis. Sehr starke Vakuolenbildung. Milz. Peritonealzellen mit feinen roten Granulis in den Zellen. Sonst ungefärbt. Pankreas. In den Wanderzellen rote Granula und Vakuolen in allen Größen im Gegensatz zu den in der Hauptsache blauen Makrophagen.

Netz hauptsächlich purpurfarben. Riesige blaue Granula in Vakuolen. Einige blaue Granula entstehen in roten.

Nebenniere-, Wanderzellen in Uterusmuskulatur leicht rosa.

Niere rote Granula in den Hauptstücken.

Leber sehr stark gefärbt.

Blaßrosa Granula in den Sternzellen und einige in den Leberzellen.

Dichte Klumpen blauer Nadeln in den Leberzellen.

Blau fehlt in den Kupfferschen Sternzellen, wo jede Vakuole rot ist.

Magen und oberer Darm mit roten Inhaltsmassen.

Retroperitoneale Lymphdrüsen mit feinen roten Granulis.

Herz einige rote Granula im Endokard und Perikard.

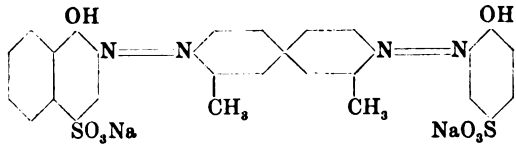
Aorta Elastica rot.

Thorakale Lymphdrüsen enthalten tiefblaue und rote Vakuolen.

Kopfhaut einige blaßrosa Granula in den Wanderzellen.

In einem anderen Falle wurden auch einige rosa Vakuolen in den Wanderzellen des Pankreas gefunden, die blaue Einschlüsse enthielten.

524. Act. Salzfreies Farbmuster.



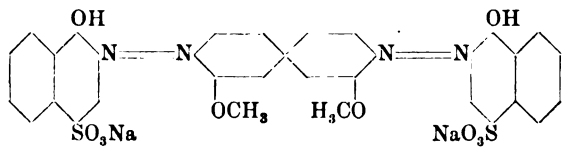
2 weiße Mäuse 0,5%ige Lösung je 1 ccm intraperitoneal den 7., 10., 13., 16., 20., 24., 27., 30. XII. 12 und 2. I. 13. Die Mäuse werden am 21. XII. zum ersten Male hellviolett an den Ohren. Die eine Maus stirbt am 31. XII., die andere ist am 3. I. hellviolett und gesund. Getötet den 3. I.

Bauchwand schwarzblau mit ungeheuren Massen vital gefärbter Zellen. Metachromasie! (Blau und violett.) Viel freie Flüssigkeit mit vital gefärbten Makrophagen, die blaue Granulis enthalten, die meist in violetten oder farblosen Vakuolen liegen. Die Kupfferschen Sternzellen der Leber enthalten viele violette Vakuolen mit blauen Granulis +++++++++, Milz +++++++++, Nebenniere nur wenige violette Granulis im Mark. Niere +++, violette Granulis in den Tubuli contorti. Netz dick geschwollen +++++++++. Pankreas violett und blau +++++++++. Thorakal. Lymphdr. +++++++++ reinblau. Daneben stark verfettete Thymus mit nur violetten Granulis in Wanderzellen. Herzmuskulatur ++++++. Vital gefärbte Wanderzellen in Muskulatur und gefärbte Serosazellen. Muskulatur am Hals nur ganz vereinzelte Zellen mit violetten Granulis.

Metachromasie: Wäßrige violette Lösung + Alkohol violettrot. Wäßrige Lösung + Alaun violette voluminöse Fällung. Dieselbe Lösung erhitzt und wieder abgekühlt gibt eine dichte blaue Fällung.

Baumwolle wird violett gefärbt.

523. Act. Salzfreies Farbmuster.



2 weiße Mäuse 0,5%ige Lösung je 1 ccm intraperitoneal den 7., 10., 13., 16., 20., 24., 27., 30. XII. 1912, 2., 6., 10., 13. I. 1913. Am 13. I. wird eine Maus in toto in Formalin eingelegt, die andere Maus ist am 14. I. gesund, ungefärbt und wird getötet.

Bauchwand tiefviolett +++++++++, Metachromasie von blau zu violett! Netz ++++++, Leber ++++++, Leberzellen farbfrei, Kupffersche Sternzellen mit feinen violetten Granulis. Makrophagen große blaue und feine violette Granulis, aber auch große violette Vakuolen mit feinen dunklen Granulis darin. Niere negativ. Kopfhaut negativ.

Baumwolle wird von der Farbe blau gefärbt.

Sehr ähnliche Erscheinungen lieferte die Vitalfärbung mit Bordeaux extra. Besonders war hier das Auftreten vieler kurzer scharfer blauer Nadeln bemerkenswert.

Wieder ein anderer Farbstoff (Nr. 153) zeigte Metachromasieerscheinungen in der Niere, wo sich im Epithel der proximalen Hauptstücke rote und blaue Granula nebeneinander fanden.

Bei dem Diaminviolett N beobachtete Evans im Pankreasbindegewebe alle möglichen Übergangsstufen von Vakuolen zu Granula; oft fand sich der Farbstoff hier randständig; auch in den Kupfferschen Sternzellen der Leber konnte Evans große blaßrosa Granula oder Vakuolen wahrnehmen, die randständig blaue Granula einschlossen. Ebenso lagen glänzend blaue Granula frei im Protoplasma. Niemals waren rote Granula in Vakuolen enthalten. Im Pankreasbindegewebe fanden sich Zellen mit roten Granulis, die blaue Stäubchen enthielten.

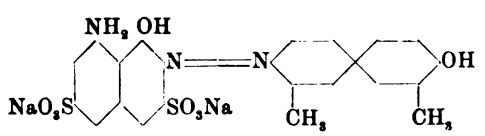
Weniger ausgeprägt — weil von rotviolett nach blau — war die Metachromasie bei salzfreien Mustern von Azoblau (524) und Benzoazurin G (523). Die histologischen Befunde geben die beigefügten Protokolle.

Wir haben damit eine Reihe metachromatisch[1]) vitalfärbender saurer Farbstoffe kennen gelernt, denen sich, wie ich feststellen konnte, noch eine ganze Anzahl weiterer Farbstoffe anschließt. Im Anfang glaubten wir, die blauen Farbstoffe seien mit roten Farbstoffen vermengt gewesen, wie etwa Trypanblau eine blaue und eine rote Komponente enthält[2]). Allein

---

[1]) Metachromasieänderung der Farbe bzw. Nuance eines Farbstoffes bei der Gewebsfärbung.

[2]) v. Möllendorff hat zwar im Gegensatz zu Groß richtig erkannt, daß bereits das Originaltrypanblau eine rote Beimengung enthält, glaubt aber, daß dieser rote Farbstoff ein Oxydationsprodukt des Trypanblaus sei. Es sei hier darauf hingewiesen, daß bei der Darstellung des Trypanblaus das tetrazotierte Benzidin sich zum Teil nur mit 1 Mol der Amidonaphtholdisulfonsäure kuppelt. Die freibleibende Disazogruppe geht in OH über, so daß dem roten Farbstoff wahrscheinlich die Formel

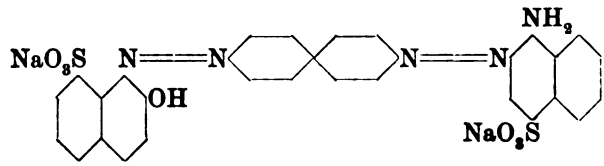


zukommt.

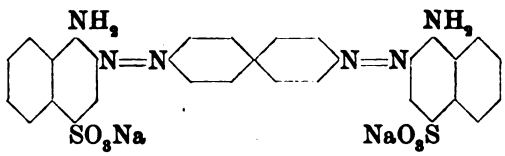
die sorgfältige Prüfung auf Verunreinigungen zeigte die völlige Einheitlichkeit der Farbstoffe; zum Überfluß wurden noch besonders reine Farbstoffmuster dargestellt, die gleichfalls Metachromasie zeigten.

a) Chemische Eigenschaften.

Kongorubin ist vermöge seiner Konstitution ein Indicator.



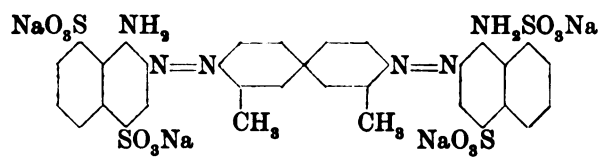
Es enthält eine α-Amino-β-azo-Gruppe, wie deren zwei in dem bekannten Indicator Kongorot



enthalten sind. Die Umschlagsgrenze liegt für Kongorubin bei 10^{-4} normal Wasserstoffionen, genau wie die Umschlagsgrenze des Kongorots.

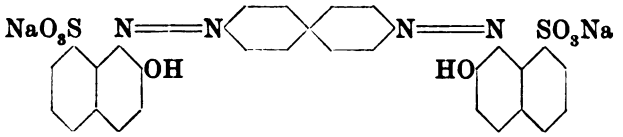
Es lag also die Möglichkeit vor, daß in einigen Zellen oder Vakuolen eine H-Ionenkonzentration herrschte, die den Farbwechsel von rot nach blau veranlaßte.

Allein Kongorot, sowie Farbstoff 537,



der vorzüglich allgemein vital färbte und als Indicator genau die gleiche Empfindlichkeit wie Kongorot hatte, färbten niemals metachromatisch vital. Erst wenn man verdünnte Salzsäurelösung zu den Präparaten zufließen ließ, gingen die roten Granula in blaue über.

Eine Indicatorreaktion war also nicht die Ursache der Metachromasie. Dies bewies außerdem noch Bordeaux extra,



das als Nichtindicator metachromatische Vitalfärbung lieferte.

b) Physikalische Eigenschaften.

Die physikalisch-chemische Untersuchung gab hier wieder des Rätsels Lösung.

Kongorubin löst sich in destilliertem Wasser mit rein rubinroter Farbe, die beim Erhitzen noch heller rot wird. Konzentrierte Lösungen zeigen einen Stich ins Violette.

Breslauer Leitungswasser löste Kongorubin mit violetter Farbe.

0,1 g Kongorubin lösen sich in 100 ccm 96%igen Alkohols zu einer orangefarbigen Lösung nicht völlig auf.

Alkoholzusatz zur wäßrigen Lösung hellt die rote Farbe auf.

Wird eine rote Kongorubinlösung langsam mit einer Chlorkaliumlösung versetzt, so wird sie rotviolett, dann violett, blauviolett, blau, und endlich kommt es zum Ausfallen des Farbstoffes in blauen Flocken.

Ganz ähnliche Befunde gab die Untersuchung der anderen Farbstoffe.

Bordeaux extra verhielt sich fast genau so wie Kongorubin, während bei Farbstoff 153, bei Diaminviolett N, bei Farbstoff 523 und 524 die Differenzen zwischen den Endzuständen nicht ganz so große waren.

Die Erklärung der beobachteten Erscheinungen liefern auch hier wieder die bereits referierten Arbeiten von Biltz, besonders seine Ausführungen über die Wirkung des Elektrolytzusatzes zu Farbstofflösungen.

Die verdünnten Lösungen von z. B. Kongorubin in destilliertem Wasser erscheinen rein rot. In dieser Lösung — als der eines Disulfokörpers — befinden sich nebeneinander polymere Farbstoffmoleküle, Farbstoffeinzelmoleküle, Farbstoffionen, Natriumionen und die Produkte der Hydrolyse, wobei sich Polymerisation und elektrolytische Dissoziation das Gleichgewicht halten. Der Elektrolytzusatz verschiebt das Nebeneinander von Einzelmolekülen bzw. deren Ionen und polymeren Molekülen

zugunsten der letzteren. Im Endzustand, d. h. wenn der Elektrolytzusatz groß genug geworden ist, fällt der Farbstoff aus der Lösung aus. Parallel mit dem stufenweisen Elektrolytzusatz wird die Farbe der roten Lösung immer mehr nach blau verschoben, bis schließlich blaue Farbstoffflocken ausfallen.

Wir sehen also, daß stufenweiser Elektrolytzusatz zur Farbstofflösung einerseits begünstigend auf die Molekülaggregatbildung wirkt, andererseits die Farbe der Lösung langsam von rot nach blau überführt.

So scheint der Schluß erlaubt, daß die Ursache der Farbvertiefung durch Elektrolytzusatz die fortschreitende Bildung bzw. Vergrößerung der Molekülaggregate ist.

Während nun viele Stoffe bei der Bildung solcher Aggregate und beim Ausflocken keine Farbänderung zeigen (z. B. Kongorot), findet bei anderen ein Farbwechsel statt (z. B. Kongorubin, Bordeaux extra usw.).

Dem hier gezogenen Schluß wohnt um so mehr Wahrscheinlichkeit inne, als er sich durch die Beobachtungen bei der Koagulation von Goldhydrosolen stützen läßt.

2. Metachromasie der Farbstoffe und der Goldhydrosole.

Goldhydrosole sind nach den Vorschriften von Zsigmondy[1]) und anderen dargestellt mehr oder weniger hellrot bzw. rubinrot, je nach der gewählten Methodik. Bei der Koagulation (z. B. durch Elektrolytzusatz) geht die Farbe von rot in violett und blau über, endlich flockt das Gold blau aus. Vollständig aufgeklärt ist die letzte Ursache für diesen Farbwechsel noch nicht[2]). Festgestellt aber ist, daß die Ultramikronen der roten Lösungen grün sind und daß in blauen Lösungen gelbe bis rotbraune Ultramikronen vorhanden sind, welche Aggregate grüner Ultramikronen vorstellen. Violette Lösungen enthalten beide Arten nebeneinander. (Die Farben der Lösungen sind für durchfallendes Licht, die der Ultramikronen für abgebeugtes angegeben.)

„Man kann kaum einen besseren Beweis als gerade diesen Farbenumschlag dafür finden, daß die Goldteilchen sich flocken-

[1]) l. c.

[2]) Vgl. Zsigmondy, l. c. S. 99 ff.

artig (d. h. durch Zusammenlagerung) und nicht nach Art der Flüssigkeitströpfchen durch Teilchenverschmelzung zu größeren Tröpfchen vereinigen. Würde letzteres der Fall sein, so müßten die Ultramikronen von koaguliertem Golde (der blau durchsichtigen Goldzerteilungen) mit den durch Wachstum entstandenen (der roten Lösungen) identisch sein, wofern sie die gleiche Masse besitzen wie dieses. Teilchen gleicher Masse und Anzahl müßten dann aber unbedingt auch den gleichen Farbenton erzeugen, unabhängig davon, ob sie durch normales Wachstum wie in den roten Lösungen, oder durch Verschmelzen von kleineren Goldtröpfchen zu größeren entstanden sind. Tatsächlich sind aber Ultramikronen, die durch Teilchenvereinigung aus kleineren entstanden sind, stets anders gefärbt als die normalen der Hydrosole, auch wenn sie die gleiche Masse besitzen wie diese. Sie können also nicht mit den ersteren identisch sein“[1]).

Diese auffälligen Übereinstimmungen zwischen dem Farbenwechsel koagulierender Farbstofflösungen und Goldhydrosole hat schon Michaelis[2]) erkannt. Er hatte gefunden, daß Fuchsin in wäßriger Lösung durch Kochsalz ausgesalzen wird. Durch Erhitzen geht das Fuchsin in der Kochsalzlösung mit roter Farbe wieder in Lösung. Kühlt man nun ab, so erhält man je nach den Umständen Flüssigkeiten, die das Licht rotviolett, intensiv blauviolett oder cyanblau durchlassen, während im auffallenden Licht die rote Farbe des Fuchsins auftritt. Ultramikroskopisch waren solche „blaue Lösungen“ optisch völlig auflösbar, während rein wäßrige Lösungen des Farbstoffes optisch nicht völlig aufgelöst werden konnten. Das Fuchsin ist in den blauen Lösungen in ultramikroskopischen Teilchen suspendiert, die das Licht blau durchlassen. Nach 24 Stunden sind solche „Lösungen“ vollständig ausgeflockt (Michaelis).

Stimmten also Farbstofflösungen und Goldhydrosole in ihrem Verhalten gegenüber Elektrolyten im Reagensglas weitgehend überein, so verhielten sie sich auch übereinstimmend im Tierversuch.

Ich injizierte eine rote kolloide Lösung von Gold (die mir die Firma v. Heyden-Dresden zu den Versuchen überließ) Mäusen

[1]) Zsigmondy, l. c. S. 107.

[2]) Michaelis, Virchows Archiv 179, 195, 1905.

und Kaninchen intravenös, subcutan und intraperitoneal. Bezüglich der Verteilung in den Zellen des tierischen Organismus ergaben sich die gleichen Gesetzmäßigkeiten, wie ich sie bei der Anwendung kolloiden Palladiums schilderte (vgl. S. 40ff.). Tschaschin[1]) hatte ähnliche Resultate; Kiyono[2]) hatte mit Kollargol genau dieselben Beobachtungen wie ich gemacht. Bei der Anwendung kolloider roter Goldlösung aber konnte ich noch feststellen, daß die Goldgranula in den vitalgefärbten Zellen sämtlich eine schwarzblaue Färbung aufweisen. Demnach zeigte auch eine kolloide Goldlösung Metachromasie bei der Vitalfärbung, genau wie sie die oben genannten Farbstoffe zeigten.

Die vergleichende Untersuchung von Farbstoffen und Goldhydrosolen hat also ergeben, daß die bei der Vitalfärbung mit den genannten Substanzen auftretenden metachromatischen Erscheinungen zurückzuführen sind auf eine partielle (Farbstoffe) oder vollständige (Farbstoffe und Goldhydrosol) Koagulation der kolloiden Lösungen. Wir haben es hier also mit einem rein physikalischen Vorgang zu tun.

3. Kritik der Versuche.

Verschiedene Gesichtspunkte machen noch eine kritische Betrachtung der gefundenen Tatsachen notwendig, ehe allgemeinere Schlüsse gezogen werden können.

Die Mehrzahl der Farbstoffe, die metachromatisch vita färben, sind die Disulfonsäuren. Wie Biltz zeigte, hält sich bei diesen Farbstoffen in wäßriger Lösung Polymerisation und elektrolytische Dissoziation die Wage. Dementsprechend zeigen sie ein geringes Diffusionsvermögen und gehören daher zu den Farbstoffen, die nur schlecht und langsam allgemein vitalfärben, während die Vitalfärbung am Injektionsort eine sehr intensive ist.

Metachromasie wurde nun hauptsächlich am Injektionsort und seiner Umgebung beobachtet; so erhebt sich die Frage, ob nicht bei der Vermischung der injizierten Farbstofflösung mit den elektrolythaltigen Körperflüssigkeiten zunächst eine partielle Koagulation eintritt. Es könnten auf diese Weise freie blaue

[1]) Tschaschin, Fol. haematol. 17, 1913.
[2]) Kiyono, Fol. haematol. 18, 1914.

Niederschläge entstehen, die phagocytiert werden und nun blaue Granula darstellen. Der nicht koagulierte rote Teil der Lösung aber könnte daneben in den gleichen Zellen rote Granula erzeugen.

Dieser Auffassung widerspricht,

1. daß selbst bei frühzeitiger Untersuchung der Tiere nach der Injektion freie blaue Niederschläge nur in geringer Menge, wenn überhaupt, auftreten;

2. daß im interstitiellen Bindegewebe des Pankreas, in den Endothelien und den Drüsenzellen der Leber und im Epithel der Hauptstücke der Nieren blaue Granula neben roten gelegentlich gefunden wurden. Die nicht diffusiblen blauen Niederschläge aber können mechanisch kaum dahin gelangen;

3. daß blaue Körnchen bzw. Granula wohl in roten Granula oder Vakuolen, nie aber rote Körnchen bzw. Granula in blauen Granulis beobachtet wurden;

4. daß unter dem Mikroskop direkt an lebenden Zellen beobachtet werden konnte, wie in roten Vakuolen blaue feste Körnchen entstanden.

Es ließe sich nun einwenden, daß im ersten Fall die Phagocytose so rasch vor sich gehe, daß freie Niederschläge nur in geringer Menge auftreten. Im zweiten Fall könnte von Pankreas und Leber angenommen werden, daß doch Saftbahnen bestehen, die den Transport fester Partikel in das Innere der Organe gestatten. Drittens wäre es denkbar, daß nach Phagocytose der freien blauen Flocken eine teilweise Lösung (Peptisierung) im Protoplasma der Zellen wieder eintrete, so daß auf diese Weise die blauen in rote Vakuolen oder Granula gelangen könnten. Demgegenüber beweist die direkte Beobachtung, daß in roten Vakuolen blaue Körnchen entstehen, was natürlich nicht ausschließt, daß ein Teil der roten Vakuolen mit blauem Einschluß auch auf dem umgekehrten Wege entstanden sein kann.

Ich glaube daher folgende Genese der farbigen Gebilde im Protoplasma annehmen zu dürfen.

4. Genese der „Granula“[1]).

Unter dem Einfluß der diffus in das Protoplasma der Zellen gelangenden Farbstofflösung kommt es zunächst zur Bildung von Vakuolen, in denen sich mehr und mehr der Farbstoff konzentriert. Gelangen genügende Farbstoffmengen in das Protoplasma und neigt der Farbstoff an sich zur Molekülaggregatbildung, so wird mit wachsender Konzentration die Polymerisation des Farbstoffes fortschreiten, bis es endlich zur Bildung mikroskopisch sichtbarer Konkremente kommt. Wachsen diese weiter, so füllen sie unter Apposition mehr und mehr die Vakuole aus, bis sie frei als Farbstoffkorn im Protoplasma liegen.

Bei den metachromatisch färbenden Substanzen lassen sich all diese Übergänge vom Anfangsstadium — der Vakuole — bis zum Endstadium — dem freien Farbstoffkorn — nebeneinander beobachten.

Da die Neigung der Farbstoffe zur Polymerisation je nach ihrer Konstitution verschieden ist, so wird der Endzustand nicht stets erreicht werden. Bei der Lithiumcarminfärbung beobachtete Kiyono[2]) zwar noch, daß die „Granula“ randständig eine „gefärbte Schale“ wie die „Kollargol. Granula“ zeigten. Bei Trypanblau und anderen Vitalfarbstoffen, die als Tetrasulfonsäuren mehr zu Dissoziation als zu Polymerisation neigen, wird der feste Endzustand wohl kaum noch erreicht. Hier haben wir es wohl mit dem Vakuolenstadium im wesentlichen zu tun.

---

[1]) Mehrfach sind nebeneinander die Ausdrücke „Granula“ und „Vakuole“ gebraucht worden. Eine exakte Unterscheidung beider Begriffe erscheint unmöglich, wenn nicht besondere Kriterien beobachtet werden können. Ein farbiges Kügelchen im Protoplasma mit homogenem Inhalt kann Granulum wie Vakuole sein. Sehen wir tanzende feste Einschlüsse im Kügelchen, wird dasselbe als Vakuole zu bezeichnen sein, verliert der farbige Protoplasmaeinschluß seine regelmäßige Form, wird er namentlich kompakt und undurchsichtig, so wird die Bezeichnung „Granulum“ oder besser „Farbstoffkorn“ berechtigt sein. In diesem Sinne sollen die Bezeichnungen weiterhin gewählt werden.

[2]) Kiyono, Fol. haematol. 18, 155, 1914.

Zu dieser Auffassung der „Granula“ als Vakuolen ist auch v. Möllendorff[1]) gekommen.

5. Natur der Granula.

Meiner Auffassung nach handelt es sich demnach bei der Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen nicht um die Darstellung „präformierter Granula“, sondern um Gebilde, die unter dem Einfluß der Farbstoffe erst entstehen. Ich befinde mich darin im Gegensatz zu der größten Mehrzahl der früheren Autoren, die präformierte Granula annehmen. Nach Ehrlich wären dies Receptoren, nach Goldmann eine Vorstufe der inneren Sekretion, eine „merkwürdige lockere Fett-Eiweiß-Verbindung“, wobei die Eiweißhülle bei der Vitalfärbung im Sinne von Bechhold als ein Schutzkolloid wirkt; nach Kiyono entstehe die Färbung durch Adsorptionsprozesse, die von der physikalischen Struktur der Granula abhängen, nach Tschaschin endlich werden die Chondriosomen durch die Vitalfärbung dargestellt.

Tschaschins Ansicht wird zum Teil schon durch die Versuche Suzukis und Möllendorffs widerlegt, die unter Anwendung der Altmannfärbung bei der Niere keine Beziehungen zwischen Altmanngranula und Vitalfärbungsgranula feststellen konnten.

Die Anschauungen dieses und der anderen Autoren werden durch die Lehren widerlegt, welche die Metachromasie gibt.

Tabelle XXIII.

	Rote Kongorubinlösung	Rotes Goldhydrosol
Schutzkolloidzusatz	rot	rot
Adsorption an Baumwolle .	rot	rot
Lackbildung mit Tonerde .	—	rot
Starre kolloide Lösung . .	—	rot
Elektrolytzusatz	blau	blau
Im Organismus	blaue u. rote „Granula“	blaue „Granula“

Verbindungen, wie sie ein Schutzkolloid mit einem Kolloid eingeht, können nicht entstehen, sonst müßten die Goldgranula rot sein; Adsorptionsverbindungen können sich aus dem gleichen Grunde nicht bilden. Auch Lack-

[1]) l. c. S. 272.

bildung, wie das Entstehen einer starren kolloiden Lösung, kann nicht die Ursache der Vitalfärbung sein, denn ein Tonerdehydrogel gibt rote Goldlacke und eine starre kolloide Goldlösung — Rubinglas — ist gleichfalls rot. Blaue Färbung tritt nur ein bei der Koagulation der Lösungen und bei der Vitalfärbung.

Danach können die Theorien der genannten Autoren für die von diesen Farbstoffen vitalgefärbten Zellen nicht zutreffen.

In diesem Zusammenhang sei noch darauf hingewiesen (vgl. S. 29 u. 33 dieser Arbeit), daß ein Farbstoff verschiedene Wirkung haben kann. Trypanblau färbt z. B. Granula in den Epithelzellen des Plex. chorioideus, Epithelkörpers, der Hypophyse und Nebenniere. Diese Granula haben eine präformierte Grundlage und sind auch durch andere Methoden darstellbar. Sie zeigen aber schon äußerlich ein ganz verschiedenes Aussehen von den Trypanblaugranula, wie sie z. B. in Histiocyten entstehen. Dieser Unterschied dokumentiert sich weiterhin darin, daß hochkolloide Stoffe, wie die Metallhydrosole sie nicht zu färben vermögen. Von diesen Zellen gelten meine Ausführungen auch nicht.

Das Verhältnis der Supravitalfärbung mit Neutralrot zur Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen auszuarbeiten, war mir leider nicht mehr möglich. Ebenso konnte ich die hier mitgeteilten Beobachtungen nicht mehr durch biologische Untersuchungen besser diffusibler Farbstoffe als Kongorubin ergänzen, die im physikalischen Versuch bereits ihre metachromatischen Eigenschaften offenbart hatten.

6. Speicherungsvermögen der vitalfärbbaren Zellen.

Es erhebt sich nun die Frage, weshalb nur ein Teil der Zellen des tierischen Organismus die Säurefarbstoffe und Metallkolloide speichert, während die übrigen Zellen frei davon bleiben. Da ist es bemerkenswert, daß die färbbaren Zellen auch noch bei anderen Vorgängen im Organismus eine gewisse Verwandtschaft untereinander zeigen. In die Betrachtung dürfen freilich nicht die eben erwähnten Zellen einbezogen werden (Hypophyse, Epithelkörper usw.), von denen wir bereits wissen, daß die Vitalfärbung mit Säurefarbstoffen präformierte Zell-

bestandteile darstellt — eine Färbung, die sich erheblich von der Vitalfärbung, z. B. der Histiocyten, unterscheidet.

In die Gruppe der übrigen Zellen dringen ein und werden gespeichert:

1. Säurefarbstoffe, für die ich die Bedingungen bereits ausführlich darlegte. Betont sei hier noch, daß die mehr oder weniger lokale Vitalfärbung mit der allgemeinen identisch sein muß. Gelingt es doch, durch Änderung des Injektionsmodus bei nur lokal vitalfärbenden Farbstoffen alle auch sonst vitalfärbbaren Zellen zur Speicherung zu bringen. Bedingung ist also nur, daß der Farbstoff mechanisch zu den Zellen gelangen kann. Beweisend für die Identität des Vorganges ist ferner, daß es auch bei zunächst sehr streng lokal vitalfärbenden Substanzen gelingt, durch lange fortgesetzte Injektionen doch meist auch noch eine — wenn auch schwache — Allgemeinfärbung zu erzielen.

2. Metallkolloide, die sich in ihrem biologischen Verhalten voll und ganz den schwer diffusiblen Säurefarbstoffen anschließen, wie ich in eigenen Versuchen zeigte, wie ferner auch Tschaschin (l. c.) und namentlich Kiyono (l. c.) darlegten.

3. Tuberkelbacillen. Als erster konnte Goldmann[1]) nachweisen, daß die am Aufbau des Tuberkels hauptsächlich beteiligten Zellen — die „Epitheloidzellen" — vitalfärbbar sind. Diesen Nachweis hatte Schlecht[2]) mit der Lithium-Carmin-Methode nicht führen können. Kiyono holte dies später nach. In seiner Zusammenfassung über Vitalfärbung und Tuberkulose (S. 187) sagt er:

„Die Histiocyten spielen als phagocytäre Epitheloidzellen eine große Rolle. Sie stammen teils aus dem Blut, teils aus den im Gewebe präexistierenden Zellen. Zu den letztgenannten Zellen gehören die Plasmatocyten des Bindegewebes, die Retikuloendothelien der Milz, Lymphdrüse, Knochenmark und die Kupfferschen Sternzellen der Leber, die alle normalerweise Histiocyten bilden können. Diese Zellen phagocytieren also isolierte selbständige Zellen in den Tuberkeln die Bacillen und weiterhin Zellelemente.

---

[1]) Goldmann, Bruns Beitr. 1912, 55 ff.

[2]) Schlecht, Zieglers Beitr. 40, 1907.

Die Epitheloidzellen der Tuberkulose sind keine einheitlichen Zellen, sie stammen zum Teil aus den Histiocyten, zum Teil aus anderen Gewebszellen (Fibroblasten)."

Evans, Bowmann und Winternitz[1]) erhoben die gleichen Befunde bei der Lebertuberkulose. Sie betonen auch, daß die Wirkung der Vitalfarbstoffe auf den Organismus ähnlich wie die der Tuberkelbacillen sei. „Chronische" Vitalfärbung führe — freilich erheblich langsamer — zu den gleichen Veränderungen wie die Infektion eines Kaninchens mit Rindertuberkulose.

Genau das gleiche konnte ich in einer großen Reihe von Versuchen bei der Peritoneal- und bei der Lungentuberkulose des Kaninchens feststellen. Ebenso verhalten sich Affen gegenüber Tuberkulose und Vitalfärbung.

4. Erythrocyten und Mikrophagen. In meiner ersten Arbeit über vitale Färbung[2]) wies ich bereits darauf hin, daß vitalgefärbte Zellen — Makrophagen — artfremde Erythrocyten phagocytieren. Ich konnte ferner an Schnittpräparaten von Blutlymphdrüsen (vergl. die Abbildung ebenda) zeigen, daß freie Histiocyten wie sessile Retikuloendothelien arteigene Erythrocyten in sich aufnehmen. Das gleiche gilt von den Kupfferschen Sternzellen der Leber. Die zahlreichen, später von anderen Autoren erschienenen Arbeiten haben meine damaligen Befunde ganz erheblich erweitert. Goldmann und Kiyono stellten nicht nur fest, daß die Histiocyten Erythrocyten phagocytieren, sie fanden auch, daß — namentlich bei der Wundheilung — die zuerst erscheinenden Leukocyten und ihre Trümmer, wie auch sonstiger Zelldetritus von den vitalfärbbaren Zellelementen phagocytiert werden. Steudemann[3]) schildert neuerdings ausführlich, daß von den vitalgefärbten sessilen und mobilen Zellen der Milz aufgenommen werden: polymorphkernige Leukocyten (basophile Zerfallsprodukte) und Erythrocyten (Pigmentbildung). Über Phagocytose von Taubenerythrocyten cf. Kiyono[4]).

5. Chinesische Tusche. Wir haben es hier mit einer feinen Suspension bzw. kolloiden Lösung von Ruß zu tun, die meist

---

[1]) Evans, Bowmann und Winternitz, Centralbl. f. Bakt. **65**, 403, 1912. Dieselben, Journ. exp. Med. **19**, 1914.

[2]) Schulemann, Arch. f. mikr. Anat. **1912**.

[3]) Steudemann, Fol. haematol. XVIII, 1914.

[4]) Kiyono, Carminspeicherung, **1914**, 44/45.

wohl Gelatine als Schutzkolloid enthält. Entsprechend der mangelnden Diffusibilität ist die Verteilung im Organismus eine beschränkte. Doch haben die Versuche von Goldmann und Kiyono auch hier gezeigt, daß die Rußteilchen im wesentlichen von den mit sauren Farbstoffen vitalfärbbaren Zellen aufgenommen werden. Nur ein verschwindend kleiner Teil wird von polymorphkernigen Leukocyten (Mikrophagen) phagocytiert (ebenso wie bei Kollargol).

6. Gallenfarbstoffe. Wie die Untersuchungen Kiyonos zeigen, färben die nach Choledochus-Unterbindung in den Körper übertretenden Gallenfarbstoffe ebenso vital wie z. B. Lithiumcarmin.

7. Cholesterin. Nach den von Anitschkow[1]) ausgeführten Versuchen lagert sich das Cholesterin im wesentlichen in den Zellen ein, die vitalfärbbar sind. Die Parallelität ist aber keine so vollkommene wie bei den bisher genannten Substanzen.

Endlich hat Goldmann darauf hingewiesen, daß Glykogen und Fett in ihrer Verteilung im Organismus gewisse Beziehungen zur Vitalfärbung zeigen sollen. Diese Beobachtungen sind aber so wenig ausgearbeitet, daß es nicht möglich ist, sie hier zu verwerten.

Wir können also feststellen, daß von ein und derselben Zellkategorie aufgenommen werden:

1. Säurefarbstoffe in jedem Lösungszustand,
2. Metallkolloide,
3. Tuberkelbacillen,
4. Erythrocyten und polymorphkernige Leukocyten,
5. Chinesische Tusche,
6. Gallenfarbstoffe,
7. Cholesterin.

7. Eigenschaften der gespeicherten Substanzen.

a) physikalische.

So heterogen all diese Substanzen erscheinen, so haben sie doch — soweit sich dies feststellen lässt — eine gemeinsame Eigenschaft: Bei der Kataphorese wandern sie zur Anode.

[1]) Siehe bei Kiyono, Fol. hamat. 18, 153, 161, 1914.

Saure Farbstoffe — sowohl kolloide wie krystalloide — wandern zur Anode[1]).

Denselben Wanderungssinn im Potentialgefälle zeigen die Teilchen von Metallhydrosolen wie Gold, Silber, Platin[2]).

Bacillen zeigen vielfach anodische Konvektion[3]).

Die Erythrocyten und Leukocyten des Menschen- und Froschblutes wandern in isotonischer Neutralsalz- oder Rohrzuckerlösung zur Anode[4]).

In Suspensionen von Kohlenstoff, Carmin und Cholesterin wandern die Teilchen nach der Anode[5]).

Ob diese gemeinsame Eigenschaft tatsächlich im Zusammenhang mit der Verteilung der Stoffe im Organismus steht, ist ohne weitere Versuche nicht zu entscheiden. Es ist wohl zu beachten, daß der Wanderungssinn all dieser Teilchen außerhalb des Organismus experimentell festgestellt wurde. Geringe Änderungen im Elektrolytgehalt oder Zusatz eines zweiten Kolloides können den Wanderungssinn umkehren. Der Elektrolyt- und Kolloidzusatz, der durch Vermischung der Lösungen und Suspensionen bei der Injektion mit den elektrolyt- und kolloidhaltigen Körpersäften stattfindet, kann demnach in nicht zu übersehender Weise den Wanderungssinn der Teilchen in den Körpersäften weitgehend beeinflussen. Da Untersuchungen hierüber nicht vorliegen, ich selbst auch Versuche in dieser Richtung nicht mehr anstellen konnte, wird mein Hinweis eine Vermutung bleiben müssen. Freilich können einige Tatsachen diese Vermutung ein wenig stützen.

Auffallend erscheint es zunächst, daß die Antagonisten der sauren Farbstoffe, nämlich die basischen, bei der Injektion in das lebende Tier gerade die Zellen nicht färben, die von den sauren Farbstoffen gefärbt werden. Unter den von basischen Farbstoffen gefärbten Zellen aber finden wir die polymorphkernigen Leukocyten, die auch als Mikrophagen den Makrophagen, die von sauren Farbstoffen vitalgefärbt werden, gegenübergestellt werden. Auch bei der Phagocytose kommt dies

---

[1]) Zsigmondy S. 44.
[2]) Zsigmondy S. 44.
[3]) Vgl. bei Hoeber, Physik. Chem. d. Zelle **1911**, 344ff.
[4]) Hoeber, Arch. f. d. ges. Physiol. **101**, 607, 1904; **102**, 196, 1904.
[5]) Hoeber, Phys. Chem. 298, 344.

zum Ausdruck. Der Mikrophag frißt das, was der Makrophag nicht aufnimmt und umgekehrt. Wohl aber vermag der Makrophag den Mikrophagen zu phagocytieren.

Kiyono beobachtete ferner, daß nach Injektion von chinesischer Tusche (Kohlenstoffsuspension) und von Kollargol die Hauptmenge von den Makrophagen, nur verschwindend wenige Teilchen von Mikrophagen aufgenommen werden. Namentlich bei Anwendung von Kollargol findet er, daß diese Einschlüsse in polynukleären Leukocyten nach ihrer unregelmäßigen Gestalt und Verteilung durch Phagocytose amorpher Niederschläge, die bei der Injektion entstanden seien, gelangen. Nun wissen wir aber, daß die beim Ausflocken einer kolloiden Lösung ausfallenden Teilchen ihre elektrische Ladung verloren haben. Mit dem Verlust der negativen Ladung aber findet Aufnahme in die andere Art der Phagocyten — in die Leukocyten statt. Damit ist auch ein Einwand Kiyonos, der sich darauf stützte, daß Leukocyten auch gelegentlich Tuscheteilchen aufnehmen, gegen meine Theorie besprochen.

Betont aber sei nochmals, daß der Gedanke, daß das Verhalten der Substanzen im elektrischen Potentialgefälle von Einfluß auf die Verteilung im Organismus sei, eine kaum bewiesene Vermutung ist. Stets muß man sich vor Augen halten, daß die Vermischung der injizierten Lösung oder Suspension mit den Körpersäften eine völlige oder teilweise Umladung oder Entladung zur Folge haben kann[1]), eine Tatsache, die vielleicht auch erklären kann, weshalb manchmal Teile einer kolloiden Lösung sich biologisch anders verhalten als die Hauptmenge. Von großem Interesse wäre es, die Verteilung der kolloiden Metallhydroxyde, die zur Kathode wandern, biologisch zu untersuchen.

b) Größenverhältnisse.

Einiges Licht auf das Verständnis der Eigenschaften der vitalfärbbaren Zellen, die ihnen die Aufnahme so viel verschiedener Substanzen ermöglichen, wirft vielleicht auch die

---

[1]) Über die Einzelheiten der Erscheinungen bei der Kataphorese vgl. die bei Nernst, Theor. Chem., Zsigmondy, Kolloid-Chem., Hoeber, Physikal. Chem. zitierte Literatur, die mir hier nur zur Verfügung stand.

Betrachtung der injizierten Lösungen und Suspensionen hinsichtlich ihrer Teilchengröße.

Bei den Farbstoffen finden wir alle Übergänge vom Farbstoffion bis zur groben, absetzenden Suspension (Carmin). Aus den Versuchen von Biltz geht hervor, daß in den Lösungen vorhanden sind:

1. Farbstoffionen, deren Größe nach der Atomzahl und Konstitution variiert.

2. Farbstoffeinzelmoleküle, für die das gleiche gilt.

3. Farbstoffmolekülaggregate. Das Ultramikroskop kann einen Einblick in ihre Größe gewähren. Kleine Molekülaggregate können auch im Ultramikroskop unsichtbar bleiben; werden sie größer, so verraten sie ihre Anwesenheit durch das Auftreten eines leuchtenden Nebels (Tyndall-Phänomen). Solche Teile werden Amikronen (nach Siedentopf-Zsigmondy) genannt. Ihre absolute Größe kann sehr verschieden sein.

Werden die Molekülaggregate noch größer, so verraten sie ihre Anwesenheit durch Beugungsbildchen. Sie werden Submikronen genannt. Mikroskopisch sind sie noch unsichtbar. Erst noch größere Aggregate werden mikroskopisch sichtbar, bis schließlich Ausflockung eintritt, die das unbewaffnete Auge erkennt. Noch gröber sind Teilchen, wie sie z. B. eine durch Verreiben hergestellte Carminsuspension enthält.

Die Teilchen von Metallhydrosolen sind gleichfalls sehr verschieden groß. So können Goldlösungen enthalten:

1. Amikronen von 1 bis 3 $\mu\mu$.

2. Submikronen von 6 bis 15 $\mu\mu$.

3. Absetzende Aggregate von 0,075 bis 0,2 μ (cf. Zsigmondy, l. c. S. 15).

Bei Kollargol-Heyden fand Bechhold[1]) die Teilchengröße von 20 $\mu\mu$. Bei einer Teilchengröße von 75 $\mu\mu$ tritt Sedimentierung innerhalb einiger Stunden ein.

Die Größe der Tuberkelbacillen beträgt 1 bis 2 μ, die der menschlichen Erythrocyten 7,5 $\times$ 1,6 μ, der Leukocyten bis ca. 15 μ.

Sehr sinnfällige Abbildungen, die die Größenverhältnisse

---

[1]) Bechhold, Zeitschr. f. Chem. u. Industr. d. Kolloide, 2. Jahrg., Heft 1 u. 2.

der einzelnen Teilchen zueinander darstellen, gibt Zsigmondy S. 15 und 16 seiner Kolloidchemie.

Halten wir uns an die hier gegebenen Maße, so sehen wir, daß die vitalfärbbaren Zellen aufnehmen können:

Ionen und Moleküle verschiedener Größe, Amikronen (1 bis 3 $\mu\mu$), Submikronen (6 bis 15 bis 20 $\mu\mu$), Teilchen von 75 bis 200 $\mu\mu$, Bakterien und Zellen (1 bis 15 μ).

Während die kleineren Teilchen diffusibel sind und sich über den ganzen Organismus von selbst verteilen können, können dies die nicht diffusiblen Teilchen nicht. Bei letzteren ist es notwendig, daß sie durch die Applikationsart in direkten Kontakt mit den färbbaren Zellen gebracht werden.

Wir sehen also die mannigfaltigsten Übergänge zwischen der Größe der einzelnen Teilchen. Alle werden von unseren vitalfärbbaren Zellen aufgenommen; Bedingung ist, daß sie in Berührung mit den Zellen kommen können[1]).

Daß demnach Substanzteilchen so verschiedener Größe in gleicher Weise von denselben Zellen aufgenommen werden, zeigt, daß die Vitalfärbbarkeit der einzelnen Zellen nicht von der Diffusibilität abhängt. Die Diffusibilität ist allein maßgebend für die Verbreitung der Färbung im Organismus, nur wenn die Diffusionsgeschwindigkeit sehr hoch ist, findet Speicherung nicht mehr statt, wohl aber durchtränkt sie diffus das Protoplasma der Zellen.

Die Feststellung, daß vom vitalfärbenden Farbstoffion bis zum groben Suspensionsteilchen in der Größe der Teilchen ein kontinuierlicher Übergang in den feinsten Abstufungen besteht und alle diese Teilchen von den Zellen aufgenommen werden, gestattet vielleicht noch einen weiteren Schluß.

8. Phagocytose.

Die Aufnahme gröberer Teilchen — wie von Bakterien, Zelltrümmern und ganzen Zellen — durch die „Makrophagen“ wird als Phagocytose allgemein bezeichnet. Da nun zwischen der Aufnahme gröberer Teilchen

[1]) Es ist das auch ein Beweis, daß die „Ultrafiltertheorie“ der Vitalfärbung von Ruhland für unsere Zellen und Substanzen nicht gelten kann.

und der von Farbstoffionen, Molekülen usw. — also feinster Teilchen — nur ein gradueller Unterschied besteht, weil zwischen den beiden Endgrößen fließende Übergänge bestehen, scheint mir der Schluß einige Berechtigung zu haben, daß auch die Aufnahme feinster Teilchen (wie Ionen, Moleküle, Amikronen und Submikronen) durch unsere Zellen als Phagocytose zu bezeichnen sei. Freilich erfährt dadurch der alte Begriff der Phagocytose eine erhebliche Erweiterung, in dem auch amikroskopische Teilchen in ihn einbezogen werden. Ich glaube aber, es ist besser, eine solche Begriffserweiterung vorzunehmen, als die Wissenschaft mit einem neuerfundenen Kunstausdruck zu „bereichern", wo ein passender Ausdruck bereits besteht.

Ich werde meine Anschauung noch näher zu begründen haben.

Zunächst erhebt sich der Einwand, daß die Aufnahme eines Farbsäureions in die Zelle keineswegs der gleiche Vorgang wie die Aufnahme eines Leukocyten oder eines Metallteilchens zu sein brauche.

Es ist aber gar nicht notwendig, so heterogene Substanzen bei der Diskussion über die Teilchengröße zu betrachten. Bei unseren Farbstoffen finden wir Beispiele genügend. Ich erinnere nur daran, daß die kleinen Carminmolekülaggregate des Lithium-, Natrium- und Ammoniumsalzes der Carminsäure ganz wie die groben Carminteilchen einer wäßrigen Carminsäuresuspension von den Zellen aufgenommen werden. Der Unterschied in der Teilchengröße bedingt nur das Verteilungsbereich des Farbstoffes im Organismus. Ich verweise ferner auf die S. 87ff. dieser Arbeit gegebene Zusammenstellung. Auch dort finden wir eine ganze Reihe von Farbstoffen, die bei unter sich gleichem chemischen Aufbau sich nur durch die Zahl der Sulfonsäuregruppen unterscheiden. Die kleinen Teilchen der hochsulfonierten Farbstoffe werden ebenso wie die großen Teilchen der Farbstoffe mit wenigen Sulfonsäuregruppen von den vitalfärbbaren Zellen aufgenommen. Auch bei diesen bedingt die Teilchengröße nur den Grad der Ausbreitung der Färbung im Organismus. Weitere Beispiele enthalten die früheren Teile dieser Arbeit in Menge.

Die Zellreaktion des Organismus ist bei Applikation der

verschiedensten Lösungen und Suspensionen eine sehr ähnliche. Ich erinnere an die „Histiocytämie" bei Trypanblau, Lithiumcarmin, Kollargol, Tuberkulose usw. usw. Die Aufnahme so verschiedener Substanzen regt die Zellen in gleicher Weise zur Vermehrung an, sie ruft die gleiche Abwehrreaktion hervor.

In diesem Zusammenhang erscheint es auch von Bedeutung, auf Versuche von Mc Curdy[1]) hinzuweisen. Bei der Untersuchung der Wundheilung am Zentralnervensystem mit Hilfe der Vitalfärbung stellte er fest, daß die in den Wunden auftretenden Körnchenzellen aus Zellen (soweit ich mich erinnere, aus den Capillarendothelien) entstehen, die sessil und zunächst nicht vital färbbar sind. Durch den Wundreiz gewinnen die Zellen zunächst die Fähigkeit, Vitalfarbstoff aufzunehmen. Endlich lösen sie sich los, wandern in die Wunde und phagocytieren hier.

Entsprechende Beobachtungen machte Goldmann[2]) bei der Vitalfärbung. Er schildert zunächst den umgekehrten Vorgang wie Mc Curdy und beschreibt, wie die farbstoffhaltigen Makrophagen Zelltrümmer phagocytieren, wie mit fortschreitender Wundheilung die vorher amöboid beweglichen Zellen sessil werden, wie sie Spindelform annehmen und nun auch langsam eine Abnahme des Farbstoffgehaltes zeigen. Weiterhin stellt Goldmann es als sehr wahrscheinlich hin, daß bei der Bildung der Makrophagen aus sessilen Bindegewebszellen gleichzeitig die granuläre Struktur, Phagocytierungsvermögen und amöboide Beweglichkeit erworben werden. Diese Befunde decken sich mit denen Mc Curdys. Versuche, die ich selbst ausführte, decken sich ganz mit diesen Befunden.

Einwände gegen meine Anschauung, daß Vitalfärbung und Phagocytose im Zusammenhang stehen, hat Kiyono erhoben. Er meint, daß sich auch Zellen vital färbten, von denen nicht bekannt sei, daß sie phagocytieren. Für die Epithelien des Plexus chorioideus, der Hypophyse der Epithelkörperchen und der Nebenniere wies ich bereits darauf hin, daß die Färbung dieser Zellen einen ganz anderen Charakter als der vitalgefärbten

---

[1]) Mc Curdy führte seine Versuche 1912 im Laboratorium von Alzheimer in Breslau aus. Aus mündlichen Mitteilungen sind mir seine Ergebnisse z. T. bekannt. Inzwischen wird er sie wohl auch veröffentlicht haben.

[2]) l. c. S. 80, 1912.

Bindegewebszellen, Endothelien usw. hat. Färbt doch auch ein Farbstoff, wie z. B. Trypanblau, das elastische Gewebe, Knorpel und Knochengrundsubstanz diffus leicht an. Solche Färbungen lebloser Gebilde wird man ebensowenig als Phagocytose bezeichnen als die präformierter Zellgebilde. Solche Färbungen beruhen wohl auf ähnlichen Grundlagen wie die der Baumwolle. Sind doch auch bei metachromatischen Farbstoffen die Nuance der Elastika- und der Baumwollfärbung gleich, während die „Granula" der Makrophagen in der Nuance des ausgefällten Farbstoffes erscheinen.

Hingegen erscheinen z. B. bei Trypanblau die Granula in den Leber- und Nierenepithelien ebenso schwarzblau wie im phagocytierenden Gewebe.

Für die Leber liegen offenbar besondere Verhältnisse vor. Die Leberzellen erhalten die Granula wahrscheinlich durch Vermittelung der Sternzellen. Besonders deutlich zeigt dies ein Versuch Kiyonos (S. 200), wo Tuschepartikelchen in den Leberzellen gefunden wurden, nachdem die Sternzellen von Tuscheteilchen überfüllt waren. Ebenso ist dies ja vom Transport so großer Teilchen, wie sie Erythrocyten darstellen, bekannt.

Daß die Nierenepithelien Farbstoffe und Kolloidlösungen, die nichtdiffusible Teilchen enthalten, nicht speichern, findet seine hinreichende Erklärung darin, daß weder bei subcutaner, intraperitonealer und intravenöser Injektion die Farbstoff- und Kolloidteilchen in unmittelbaren Kontakt mit den Nierenepithelien kommen können. In die Epithelien der Hauptstücke kommen ja nur solche Farbstoffe, die gelöst aus dem Blut durch die Glomerulusepithelien in die Harnkanälchen treten können. Daß aber die Nierenepithelien sich sonst sehr ähnlich wie die anderen vitalfärbbaren Zellen verhalten, geht aus den Arbeiten Kiyonos, Suzukis und v. Möllendorffs hervor. Nach ihren Versuchen ist der Vorgang der Färbung der Nierenepithelien offenbar der, daß durch Rückresorption der Farbstoff aus dem Lumen der Harnkanälchen in die Epithelien übertritt. Offenbar werden auch von den Epithelien Farbstoffteilchen der verschiedensten Größe aufgenommen. Bei Farbstoffen, die sehr zur Aggregatbildung neigen, wie z. B. das Lithiumcarmin, tritt, wie Suzuki in eingehenden Untersuchungen zuerst zeigte, der

gelöste Farbstoff durch die Glomeruli in die Harnkanälchen, wo er unter Bildung von Cylindern in körniger Form ausfällt. Aus den Kanälchen wird dann der Farbstoff aufgenommen. Ähnliche Befunde erhob v. Möllendorff bei Sulfonsäurefarbstoffen. Andererseits ist bei Farbstoffen, die zur Dissoziation in wäßriger Lösung neigen, eine Cylinderbildung nicht zu beobachten. Der Farbstoff tritt gelöst durch die Glomeruli und bleibt in den Harnkanälchen in Lösung. Kiyono zeigte ferner, daß auch Gallenfarbstoffe ebenso wie die Vitalfarbstoffe in den Nierenepithelien gespeichert werden.

Freilich um die Analogie durchaus zu bestätigen, wären noch Versuche nötig, bei denen nichtdiffusible Stoffe, in direkten Kontakt mit den Nierenepithelien gebracht, von diesen gespeichert werden. Dann erst können meine hier angeführten Wahrscheinlichkeitsschlüsse zu bindenden werden.

Einen anderen Einwand gegen die Auffassung der Vitalfärbung als Phagocytose macht Goldmann[1]):

„Was nun den Einwand anbetrifft, daß unsere Granula phagocytären Ursprungs seien, so kann ich demselben schon durch den Hinweis darauf begegnen, daß die Phagocyten par excellence, die Leukocyten, von der vitalen Färbung unbeeinflußt bleiben."

Goldmann vergißt dabei, daß es im Organismus zwei große Gruppen von Phagocyten gibt: die Mikrophagen = Leukocyten und die Makrophagen = Histiocyten. Beide Arten von Phagocyten zeigen sehr erhebliche Unterschiede. Ich wies bereits darauf hin, daß im allgemeinen die Mikrophagen meist nur das phagocytieren, was die Makrophagen nicht aufnehmen und umgekehrt. Ich machte ferner darauf aufmerksam, daß die recht hinfälligen Gebilde der Mikrophagen von den Makrophagen aufgenommen werden können. Endlich sind die Mikrophagen keineswegs die Phagocyten par excellence. Wie Marchand[2]) darlegt, ist den jungen Bindegewebszellen (Makrophagen, Histiocyten) eine weit stärkere phagocytäre Tätigkeit eigen als den Leukocyten (Mikrophagen). Gerade die Zerfallsprodukte der Leukocyten sind die kräftigsten Erreger des Phagocytismus junger Abkömmlinge der Bindegewebszellen.

[1]) Goldmann, Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 36.

[2]) Marchand, Wundheilung. Stuttgart 1901.

Kiyono erhebt fernerhin den Einwand, daß die bei manchen Farbstoffen zu beobachtende Kernfärbung lebender Zellen keineswegs als Phagocytose gedeutet werden könne. Bei einer Mitteilung über die Vitalfärbung des Sulforhodamins[1]) habe ich auch das Auftreten der Kernfärbung berücksichtigt, so daß hier auf diese Mitteilung verwiesen werden kann.

Die vorliegenden zahlreichen Versuche zeigen, daß Zellen, die mit Säurefarbstoffen vital färbbar sind, im allgemeinen auch zu phagocytieren vermögen, daß mit einer Zunahme des Vermögens zu phagocytieren die Fähigkeit, Farbstoffe zu speichern, wächst, daß unter dem Einfluß starker Farbstoffaufnahme die Zellen den gleichen Vermehrungsreiz erfahren wie nach lebhaftem Phagocytieren. Eine weitere Ähnlichkeit besteht darin, daß unter dem Reiz der vitalen Färbung die sessilen Zellelemente zunehmende Neigung zeigen, amöboid beweglich zu werden, wie denn auch starke Phagocytose die Neigung der Zellen, sich aus ihren Verbänden zu lösen und zu wandern, erhöht.

Die Erscheinung der amöboiden Beweglichkeit aber hat nach den jetzigen Anschauungen der Physiologen die gleichen Ursachen wie die Phagocytose. So sagt Luigi Luciani[2]):

„Nach den neueren Untersuchungen von Leber, Massart, Bordet und anderen würden die Erscheinungen der Emigration und der Phagocytose bei den weißen Blutkörperchen Erscheinungen von Chemotaxis darstellen, d. h. der Eigenheit, durch gewisse chemische Verbindungen angezogen oder abgestoßen zu werden."

Ähnlich sagt Johannes Müller[3]) nach der Darstellung der amöboiden Bewegung:

„Der Effekt (der amöboiden Bewegung) kann auch ein anderer sein; lag ein festes Partikelchen in der Nähe und wurde dieses von zwei Protoplasmafortsätzen umflossen, so wird es durch Verschmelzen und Zurückziehen der Pseudopodien in die Zelle aufgenommen. Das Partikelchen ist vom Leukocyten sozusagen ‚gefressen' worden."

Die Untersuchungen über die amöboide Bewegung haben

[1]) Schulemann, Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. 7, 1915.
[2]) L. Luciani, Physiol. d. Menschen. Jena 1905, 1, 80.
[3]) Zuntz u. Loewy, Lehrb. d. Physiol. Leipzig 1909, 362.

auch zu einem tieferen Einblick in das Wesen der Phagocytose geführt, nachdem erkannt worden war, welch enge Beziehungen beide Vorgänge verknüpfen.

In früherer Zeit hatte man die Ausstreckung eines Pseudopodiums als eine aktive Tätigkeit der Zelle aufgefaßt, bis dann J. Gad[1]) an Öltropfen, die er in einer Alkalilösung suspendiert hatte, amöboide Bewegung beobachtete. Mit freier Fettsäure an der Oberfläche des Tropfens bildete das Alkali Seifen, und wo diese „lokale Seifenbildung" stattfand, wurde die Oberflächenspannung lokal erniedrigt und daher ein Pseudopodium ausgestreckt.

Ähnliche Beobachtungen machte später Bernstein[2]) an Quecksilbertropfen. Er erreichte amöboide Bewegung durch lokale Chromatbildung.

Mit dem Problem der Bewegung von Öltropfen beschäftigte sich weiterhin Quincke[3]).

Aber nicht allein die Aussendung von Pseudopodien ließ sich auf diese Weise hervorrufen, sondern auch Lokomotion. So veranlaßte Rhumbler[4]) Rizinusöltröpfchen, die in 80%igem Alkohol suspendiert waren, in Capillaren hinein zu wandern, die Nelkenöl, 5%ige Kalilauge und andere Stoffe als „Lockmittel" enthielten.

9. Oberflächenspannung und Vitalfärbung.

Diese und andere Versuche gestatten die Annahme, daß der amöboiden Beweglichkeit freier Protoplasmen lokale Änderungen der Oberflächenspannung zugrunde liegen.

Michaelis[5]) hat diese Verhältnisse in seiner Dynamik der Oberflächen (S. 15 bis 17) gewürdigt. Nach seiner Ansicht

[1]) J. Gad, Zur Lehre von der Fettresorption. Du Bois-Reymonds Arch. d. Physiol. 1878.

[2]) J. Bernstein, Chemotropische Bewegung eines Quecksilbertropfens. Pflügers Arch. 80, 1900.

[3]) Quincke, Über periodische Ausbreitung von Flüssigkeitsoberflächen und dadurch hervorgerufene Bewegungserscheinungen. Sitzungsber. d. kgl. preuß. Akad. d. Wissensch. Berlin, 34, 1888.

[4]) Rhumbler, Physikalische Analyse und künstl. Nachahmung des Chemotropismus lebender Zellen. Physik. Zeitschr. 1890.

[5]) Michaelis, Dynamik der Oberflächen. Dresden 1909.

ist die amöboide Protoplasmabewegung bedingt durch wahrscheinlich lokale fermentative Prozesse unter der Wirkung von Reizen, die zur Bildung von Stoffen führen, die verändernd auf die Oberflächenspannung wirken.

Hamburger[1]) (S. 73) kommt zu der Auffassung, daß Beschleunigung der amöboiden Bewegung auch eine Beschleunigung der Phagocytose zur Folge hat.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen führen demnach zu dem Ergebnis, daß sowohl bei der amöboiden Bewegung wie bei der Phagocytose Änderungen in der Oberflächenspannung die Ursache sind. Da nun viele Beziehungen zwischen Phagocytose und vitaler Färbbarkeit aufgefunden worden sind, erscheint mir der Gedanke verlockend, anzunehmen, daß auch bei der vitalen Färbung bei unseren Zellen die Oberflächenspannungsänderungen eine Rolle spielen.

Einen Einfluß auf die Oberflächenspannung haben auch die meisten Säurefarbstoffe. Es wäre wohl denkbar, daß hierdurch die Aufnahme der Farbstoffe in die Zellen bedingt wird.

Man könnte zwar bei Farbstoffen, die Diffusionsfähigkeit haben, vermuten, daß sie allein durch eben diese Fähigkeit in die Zelle gelangen. Diese Erklärung aber stößt auf Schwierigkeiten, denn sie sagt einmal nicht, warum die Farbstoffe in hoher Konzentration — selbst bis zum Ausflocken — in der Zelle angehäuft[2]) werden, sie vermag ferner nicht anzugeben, wie z. B. Teilchen eines Metallhydrosols oder einer Suspension, die nicht diffundieren können, in das Zellinnere gelangen.

Während sich bei Farbstofflösungen an der Grenze Lösung/Luft eine mehr oder weniger starke Erniedrigung der Oberflächenspannung nachweisen läßt, haben Suspensionen und Metallhydrosole die gleiche Oberflächenspannung wie Wasser. In solchen „Lösungen" aber befinden sich bereits corpusculäre Teilchen, die trotz mangelnder Diffusionsfähigkeit die Protoplasmagrenze passieren. Diese Teilchen sind mit Bakterien und Zellen durch mannigfache Eigenschaften (Größenabstufung,

[1]) Hamburger, Osmot. Druck u. Ionenlehre. Berlin 1912.

[2]) Käme nur Diffusion in Frage, so könnte wohl nur so lange Farbstoff in die Zelle diffundieren, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist.

Kataphorese usw.) verwandt. Da von den großen Teilchen angenommen wird, daß sie vermöge ihrer Oberflächenaktivität in die Zellen bei der Phagocytose eintreten, wird man von den kleinen Teilchen — die ja nach meiner Ansicht auch phagocytiert werden — annehmen dürfen, daß auch ihnen Oberflächenaktivität zukommt. Diese Oberflächenaktivität aber hätte dann ihren Sitz in der Grenze fest/flüssig und läßt sich experimentell nicht bestimmen.

So müssen meine Vermutungen Vermutungen bleiben, da dem Experiment hier noch Grenzen gezogen sind.

Auf anderem Wege gelangte bereits J. Traube zu einer ähnlichen Anschauung. Er sagt, Stoffe, die die Oberflächenspannung erniedrigen, reichern sich in der Oberfläche an; sie haben „das Bestreben, die Lösung zu verlassen" und neigen dazu, unter geeigneten Bedingungen durch die Grenzfläche hindurch in das andere Medium zu wandern. Traube schreibt den Lösungen einen „Haftdruck" zu, der neben dem „Haftdruck" in der hypothetischen Zellmembran Ursache des Eintritts der Stoffe in die Zelle sei.

Hoeber weist diese Theorie zugunsten der von ihm immer wieder verteidigten Lipoidtheorie scharf zurück; gewiß hat die Haftdrucktheorie trotzdem auf eine Tatsache aufmerksam gemacht, die wohl Beachtung verdient, obwohl auch sie keineswegs alles erklären kann. So erniedrigen auch basische Farbstoffe die Oberflächenspannung von Luft: Farbstofflösung, ohne daß aber der Farbstoff in unsere Zellen eindringen kann. Dann aber vermag die Theorie nicht zu erklären, warum nicht alle Zellen des tierischen Körpers die Säurefarbstoffe aufnehmen.

Ebensowenig aber kann Hoeber dies erklären mit der Lipoidtheorie. Er sagt, die vitalfärbbaren Zellen — insbesondere die Nierenzellen — importierten die Farbstoffe vermöge einer besonderen „physiologischen Permeabilität", womit er die Lipoidtheorie zu retten hofft. M. E. hat Hoeber sich damit auch nur der „Übersetzung eines unbekannten Vorganges in eine andere Sprache" bedient — wie er Traube Seite 231 vorwirft —, ohne eine Erklärung zu geben. Nur von weiteren experimentellen Untersuchungen können wir einen Aufschluß über diese Lebensvorgänge der Zellen erwarten und werden uns jetzt besser sagen, daß wir eine Erklärung noch nicht

geben können. Und Lebensvorgänge sind es wohl, was wir beobachten. Wie wäre es sonst zu erklären, daß z. B. die Nierenepithelien des Frosches in geringerem Umfang die Säurefarbstoffe speichern, als die entsprechenden Nierenzellen der Maus? Wie wäre es zu verstehen, daß die Leberzellen der Maus keine Trypanblauteilchen aufnehmen, während in den Leberzellen des Kaninchens bei der Vitalfärbung mit Trypanblau massenhaft Farbstoffteilchen in den Zellen auftreten? All das sind eben besondere Eigenschaften der Zellen, die wir durch chemische oder physikalische Gesetzmäßigkeiten noch nicht erfassen können. Aus diesem Grunde wage ich auch nicht, so weitgehende Schlüsse zu ziehen, wie dies neuerdings v. Möllendorff[1]) getan hat. So sehr ich auch im allgemeinen mit den Versuchsergebnissen dieses so verdienstvollen Forschers übereinstimme, so muß ich doch seinen Schlußfolgerungen einige Einwände machen.

v. Möllendorff ist der Ansicht, daß gerade dort eine Vitalfärbung eintritt, wo eine ständige starke Durchströmung der Zellen mit Farbstofflösung anzunehmen ist. Seine Versuche beziehen sich im besonderen auf Niere und Leber. Für die Niere weist v. Möllendorff selbst, ebenso wie Suzuki u. a. m., nach, daß die Farbstoffe wohl zunächst durch den Glomerulus filtriert werden. Diese stark durchströmten Glomeruluszellen bleiben aber fast stets ohne Farbstoffspeicherung. Diese tritt erst in den Epithelien der Tubuli contorti ein. Ob und in welcher Richtung die Epithelien durchströmt werden, ist noch nicht erwiesen. Sehr starke Speicherung sehen wir hier auch, wenn starke Farbstoffniederschläge im Lumen der Tubuli contorti entstanden sind. Hoch diffusible Farbstoffe hingegen, die in größten Mengen die Nieren durchströmen, geben oft gar keine Vitalfärbung. Auch an der Leber sehen wir dies. Hoch diffusible Farbstoffe werden von den Sternzellen gar nicht gespeichert, nicht diffusible und Farbstoffpartikelchen werden am stärksten gespeichert, obwohl gerade diese die Zellen sicher nicht „durchströmen". Durchströmung ist also keineswegs eine Bedingung für Speicherung.

---

[1]) v. Möllendorff, Zeitschr. f. allgem. Physiol. **17**, 125, 1916. — Kolloidzeitschr. **18**, 81, 1916.

Der Hauptunterschied zwischen v. Möllendorffs und meinen Anschauungen liegt m. E. darin, daß von v. Möllendorff sowohl die Verteilung der Farbstoffe im Körper wie auch ihre Speicherung in den Zellen von denselben Gesichtspunkten aus erklären will, was ich für nicht zulässig halte, wie ich bereits früher eingehend darlegte. Nur die Verteilung der Farbstoffe im Körper ist m. E. voll und ganz durch physiko-chemische Gesetze erklärbar. Für die Speicherung fehlt noch eine vollständige Erklärung, obwohl mancher Weg zur Lösung bereits beschritten ist. Aus diesem Grunde halte ich es auch für besser, die Vitalfärbung durch den von mir erweiterten Begriff der Phagocytose zu erklären und nicht umgekehrt die Phagocytose durch die Vitalfärbung als in ihrem Wesen geklärt anzusehen, wie v. Möllendorff dies in der Kolloidzeitschrift vorschlägt.

VIII. Chemische Konstitution und Vitalfärbungsvermögen.

In unserem Zeitalter der „Chemotherapie“ ist es Brauch, zu fragen, welche Beziehungen bestehen zwischen chemischer Konstitution und biologischem Verhalten untersuchter Verbindungen?

Auf chemische Reaktion ist die Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen nicht zurückzuführen, so daß demnach auch nicht direkte Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen bestehen können.

Wohl aber sahen wir, daß die physikalischen Eigenschaften der Farbstofflösungen (Diffusibilität, Neigung zur Aggregation, Oberflächenaktivität) von der Konstitution der Farbstoffe abhängen.

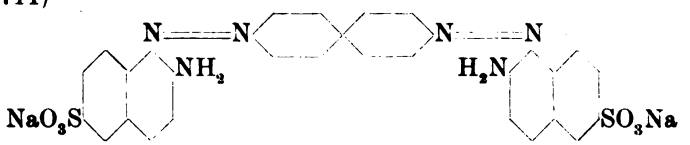
Wir lernten einmal additive Eigenschaften kennen. W. Biltz hat gezeigt, daß die Raumerfüllung des Moleküls, definiert durch die Atomzahl, die Diffusibilität der Farbstoffe bedingt.

Daneben bestanden konstitutive Eigenschaften. Biltz hat bereits gezeigt, daß die Anwesenheit und Zahl von Sulfonsäuregruppen im Farbstoffmolekül ebenso, wie sie erhöhend auf die Löslichkeit der Farbstoffe in Wasser, sehr deutlich steigernd auf die Dialysierbarkeit wirkt.

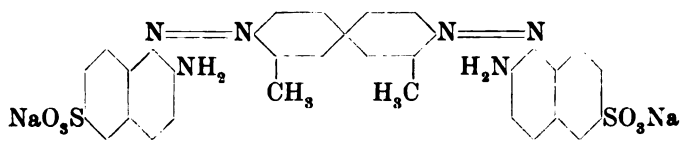
Ich selbst wies bereits Seite 87 dieser Arbeit darauf hin,

daß dieser Einfluß der Sulfonsäuregruppen auf Dialysierbarkeit und damit Verteilung der Farbstoffe im Tierkörper deutlich zutage tritt, zeigte aber auch Seite 21, daß nicht allein die Zahl, sondern auch die Stellung der Sulfonsäuregruppen maßgebend ist. Es sei bezüglich der Einzelheiten auf die an diesen Stellen gegebenen Zusammenstellungen hingewiesen.

Daneben aber sind auch noch andere konstitutive Eigenschaften von Bedeutung. Selbst die scheinbar so reaktionsträge Methylgruppe kann entscheidend den Löslichkeitscharakter eines Farbstoffes verändern. So ist Farbstoff Nr. 520 (D. R. P. 46 711)



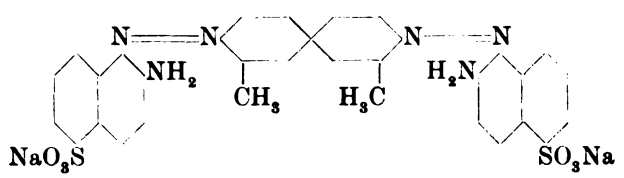
ein schön rotes, wasserunlösliches und färberisch wertloses Pulver, während Nr. 519 (D. R. P. 35 615) Benzopurpurin B



leicht wasserlöslich ist und einen wertvollen substantiven Baumwollfarbstoff darstellt; 519 färbt allgemein vital, 520 nur streng lokal. Der Unterschied zwischen 519 und 520 ist nur ein Mehrgehalt von zwei Methylgruppen bei 519.

Eine Verschiebung der Sulfonsäuregruppen in 519 von C_6 nach C_5 läßt wieder einen färberisch wertlosen, in Wasser fast unlöslichen Farbstoff

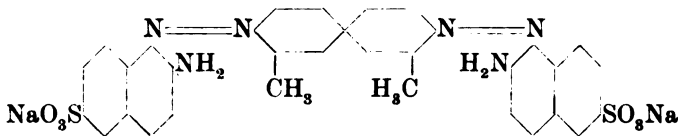
Nr. 443.



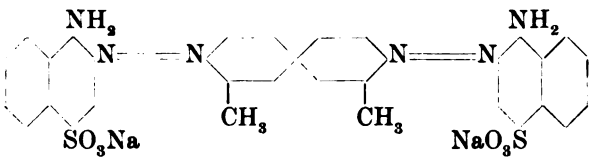
entstehen.

Ebenso lassen sich Kongo, Benzopurpurin 4 B und andere verwandte Farbstoffe bezüglich Lichtechtheit, Säureempfindlichkeit, Farbe usw. vergleichen.

Eine gewisse Gesetzmäßigkeit besteht ferner bezüglich der Stellung Auxochrom zu Chromophor bei manchen Farbstoffen. So ist Benzopurpurin B



ein — allerdings mäßiger — Vitalfarbstoff, während Benzopurpurin 4 B



nur lokal vital färbt. Auch bei Oxyazofarbstoffen tritt dies Verhalten hervor. Das Chromophor in α-, das Auxochrom in β-Stellung scheint günstiger für die Verteilung der Farbstoffe im Körper zu sein, als die umgekehrte Stellung der beiden Atomgruppen.

Es ließe sich noch eine sehr große Zahl solcher Beispiele aufstellen, welche konstitutionelle Besonderheiten zeigen, die begünstigend auf das Vermögen, allgemein vital zu färben, wirken. Diese Gesetzmäßigkeiten sind aber stets nur auf engumgrenzte, nahe verwandte Farbstoffgruppen beschränkt, so daß ich von weiteren Beispielen absehe.

Eine Erklärung für diese Erscheinungen zu geben, erschienen die Arbeiten Ostwalds und anderer geeignet[1]).

Die elektrolytische Dissoziationsfähigkeit organischer Säuren und Basen hängt mit dem Bau ihres Radikals zusammen. Es ist im allgemeinen zu unterscheiden zwischen:

1. negativierenden Radikalen wie C_6H_5, OH, S, Halogenen usw., die durch Eintritt in das Molekül der Verbindungen die Aufnahme der (negativen) Anionenladung befördern,

2. positivierenden Radikalen, wie NH_2, CH_3, C_2H_5, H usw., die begünstigend auf die Aufnahme der (positiven) Kationenladung wirken.

---

[1]) cf. Nernst, Theoretische Chemie VII. Aufl. S. 541.

Neben diesen additiven kommen auch konstitutive Einflüsse zur Wirkung, d. h. nicht nur Zahl und Art, sondern auch Stellung der Radikale im Molekül und zueinander beeinflussen die Dissoziationsfähigkeit (Unterschiede der o-, m- usw. Stellung in aromatischen Kernen).

Ferner ist an den Einfluß der Radikale aufeinander und die dadurch bedingte Modifikation der Dissoziationsfähigkeit zu denken.

Nernst bemerkt hierzu (S. 542), daß wir bei der Betrachtung des Einflusses eingeführter Radikale auf die Lichtabsorption des Chromophors auf ähnliche Verhältnisse stoßen, was im Zusammenhang mit vorliegender Arbeit besonders bedeutungsvoll erscheint.

Im Lichte der Ostwaldschen Arbeiten kann es so verständlich erscheinen, warum ein Amidoazofarbstoff — mit dem positivierenden NH_2-Radikal — schlechtere allgemeine Vitalfärbung geben kann als ein Oxyazofarbstoff sonst gleicher Konstitution — aber mit dem negativierenden OH-Radikal.

Komplizierter schon wäre die Erklärung, warum das eben angeführte Benzopurpurin B besser allgemein vitalfärbt als das Benzopurpurin 4B. Daß konstitutive Einflüsse hier maßgebend sind, ist ja zweifellos, doch müßte eine eingehendere Erklärung der Einflüsse — etwa unter Zuhilfenahme der Lehre von der Teilbarkeit der Valenz — gar zu hypothetisch erscheinen, so verlockend dies auch nach den Arbeiten Kauffmanns[1]) und besonders Gebhards[2]) wäre.

Noch verwickelter scheinen uns die Verhältnisse bei den S. 134 angeführten Farbstoffen 520 und 519 zu liegen.

Die positivierende CH_3-Gruppe in 519 müßte die Dissoziationsfähigkeit des Farbstoffes gegen 520 herabsetzen, wenn hier so einfache Verhältnisse wie in der Fettsäurereihe (Ameisensäure, Essigsäure usw.) herrschen würden. Allein der Dissoziationsgrad von 519 scheint — nach unseren Versuchen zu schließen — höher als der von 520 zu sein. Hier ist zu berücksichtigen, daß die CH_3-Gruppen in ein kompliziertes Molekül eintreten

[1]) Kauffmann, Die Valenzlehre. Stuttgart 1911.

[2]) Gebhard, Journ. f. prakt. Chemie. Neue Folge **84**, 561, 1911, **86**, 540, 1912. Chem.-Ztg. **1913** (Cöthen), Nr. 59, 61, 63, 66, 67, 71, 76.

und nur über den Benzidinkern, die chromophoren Azogruppen und die Naphthalinkerne auf die dissoziationsfähigen SO_3H-Gruppen wirken können. Ja gerade die Zwischenschaltung des Chromophors zwischen CH_3 und SO_3H läßt die Umkehrung der positivierenden CH_3-Wirkung in diesem Falle in eine negativierende wahrscheinlich werden.

Spezielle Schlüsse, sowie das Eingehen auf Einzelheiten erscheinen mir noch nicht erlaubt.

Wohl aber ergeben sich folgende Gesichtspunkte:

Die Atomgruppen wirken intramolekular auf das Molekül, in das sie eintreten, und umgekehrt modifiziert das Molekül durch Rückwirkung auf die eingetretene Atomgruppe deren Reaktionsfähigkeit. Die Resultante dieser Wechselwirkung kommt als physikalische und chemische Eigenschaften des Gesamtmoleküls zum Ausdruck.

Nicht willkürlich herausgerissene Atomgruppen eines Moleküls sind maßgebend für das biologische Verhalten einer Verbindung. Aus der Wechselwirkung der Atomgruppen auf die Gesamtheit des Moleküls und des Moleküls auf die Atomgruppen entspringen die chemischen und physikalischen Eigenschaften einer Verbindung, und nur aus der Betrachtung eines Moleküls als Ganzes, ja eventuell als Polymeres, kann das pharmakologische Verhalten erklärt werden.

Zusammenfassung.

Direkte Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Vitalfärbungsvermögen bestehen bei sauren Farbstoffen nicht. Auch die Betrachtung der Seitenkettentheorie im Lichte der Theorie der Farbstoffe beweist, daß chemische Reaktionen nicht die Farbstoffe an Zellbestandteile binden können.

Der Gesamtvorgang der Vitalfärbung setzt sich aus zwei Hauptphasen zusammen, die sich gegenseitig überlagern:

1. Die Verteilung der Farbstoffe im Tierkörper.
2. Die Speicherung der Farbstoffe in den vitalfärbbaren Zellen.

Maßgebend für die Verteilung der Farbstoffe im Tierkörper ist das physikochemische Verhalten der Farbstofflösungen.

Je kleiner ein Farbstoffmolekül ist, je mehr es seine Konstitution zur Dialyse befähigt, je weniger der Farbstoff zur

Molekülaggregatbildung neigt, je weniger sinkende Temperatur, zunehmendes Alter, steigende Konzentration, vermehrter Zusatz von Fremdelektrolyten die Dissoziation zurückzudrängen und die Assoziation zu fördern vermögen, um so schneller wird ein Farbstoff diffundieren, um so schneller auch diffus die tierischen Gewebe durchtränken, um so schneller wird er vom Tier wieder ausgeschieden. Solche Farbstoffe verhalten sich wie Elektrolyte.

Je größer ein Farbstoff hingegen ist, je mehr seine Konstitution es an der Dialyse verhindert, je mehr der Farbstoff zur Molekülaggregatbildung neigt, je mehr sinkende Temperatur usw. die Dissoziation zurückzudrängen und die Assoziation zu fördern vermag, um so langsamer wird der Farbstoff diffundieren, um so geringere Farbstoffmengen werden überhaupt diffusionsfähig sein, um so langsamer wird der Farbstoff die tierischen Gewebe durchtränken, um so langsamer wird er auch vom Tier wieder ausgeschieden. Solche Farbstoffe verhalten sich wie Semikolloide, sie zeigen in wäßriger Lösung teils Elekrolyt-, teils Kolloidcharakter.

Unter weiterer Steigerung der genannten Bedingungen gelangen wir endlich zu Farbstofflösungen, die nicht mehr zur Diffusion befähigt sind und den Charakter einer Kolloidlösung zeigen. Solche Farbstoffe bleiben am Injektionsort im tierischen Körper liegen, bzw. gelangen sie nur dahin, wohin in offenen Wegen die Gewebssäfte sie hintragen.

Dieser Art von Farbstoffen schließen sich zwanglos eine Reihe kolloider Metallösungen im biologischen Verhalten an.

Die Allgemeinfärbung ist auf die als Elektrolyte gelösten Farbstoffe beschränkt, bzw. auf den diffusionsfähigen Anteil der semikolloiden Farbstofflösungen. Eine scharfe Grenze ist nicht zu ziehen, da es nicht möglich ist, genau zu sagen, wo die Elektrolyteigenschaften aufhören und die Kolloideigenschaften beginnen.

Die Gesetze der Verteilung der sauren Farbstoffe im Tierkörper wären damit eindeutig festgelegt.

Für die Speicherung der Farbstoffe in den Zellen können diese Bedingungen nicht allein maßgebend sein.

Einen gewissen Einblick geben hier folgende Beobachtungen:

Bei der Vitalfärbung mit manchen Säurefarbstoffen (Kongorubin, Bordeaux usw.) und Metallhydrosolen (Gold) ist mit

der Speicherung in den Zellen eine Farbvertiefung von rot nach blau (Metachromasie) verbunden.

Es wurde bewiesen, daß die Ursache der Metachromasie nicht eine chemische Reaktion ist. Die Farbvertiefung ist allein bedingt durch die fortschreitende Bildung bezw. Vergrößerung der Molekülaggregate.

Die Speicherungsgranula in den Zellen entstehen erst unter dem Einfluß der sauren Farbstoffe.

Die mannigfaltigen Beziehungen, die zwischen amöboider Beweglichkeit, Phagocytismus und Färbbarkeit mit sauren Farbstoffen bestehen, lassen mich daran denken, daß auch bei der vitalen Färbung mit sauren Farbstoffen Oberflächenreaktionen an den Zellgrenzen eine Rolle bei der Farbstoffspeicherung spielen.

Die notwendigen Einschränkungen dieser allgemeinen Darlegung finden sich im Text der Arbeit.

Für die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Lösungseigenschaften der Säurefarbstoffe, denen sie ihre biologischen Eigenschaften (Verteilung im Tierkörper) verdanken, gilt allgemein:

Die Atomgruppen wirken intramolekular auf das Molekül, in das sie eintreten, und umgekehrt modifiziert das Molekül durch Rückwirkung auf die eingetretene Atomgruppe deren Reaktionsfähigkeit. Die Resultante dieser Wechselwirkung kommt als physikalische und chemische Eigenschaften des Gesamtmoleküls zum Ausdruck. Es ergibt sich daraus die Lehre für die Vitalfärbung im besonderen und für die „Chemotherapie" im allgemeinen:

Nicht willkürlich herausgerissene Atomgruppen eines Moleküls sind maßgebend für das biologische Verhalten einer Verbindung. Aus der Wechselwirkung der Atomgruppen auf die Gesamtheit des Moleküls und des Moleküls auf die Atomgruppen entspringen die chemischen und physikalischen Eigenschaften einer Verbindung, und nur aus der Betrachtung des Moleküls als Ganzes, ja eventuell als Polymeres kann das pharmakologische Verhalten erklärt werden.

X. Rückblick und Ausblick.

Die ersten Arbeiten über vitale Färbung mit sauren Farbstoffen sind von Ehrlich, Bouffard und Ribbert ausgeführt worden. Jedoch hat Ehrlich nur wenig von seinen Ergebnissen veröffentlicht, Bouffard begnügte sich mit einem kasuistischen Beitrag, und Ribberts Arbeiten, die sich besonders mit der histologischen Seite des Problems befaßten, verfielen mehr oder weniger der Vergessenheit.

Erst Goldmann begann 1908 mit Vitalfärbungsversuchen auf breiterer Basis und von neuen Gesichtspunkten aus. Sein früher Tod machte es ihm unmöglich, das voll Hoffnung und mit großem Erfolg begonnene Werk weiter auszubauen. In zwei groß angelegten Arbeiten aber hat er die Grundlagen der neuen Forschungsrichtung dargelegt und gezeigt, welch vielseitiger Anwendung sie fähig ist. Viele neue Tatsachen hat er gezeigt, die Lösung vieler Probleme eingeleitet und vor allem außerordentlich anregend zu neuer Arbeit gewirkt. So stehe ich nicht an, ihn als den wahren Begründer der neuen Methodik hinzustellen.

Wie befruchtend Goldmanns Arbeiten gewirkt haben, zeigt die sehr große Zahl von Arbeiten, die nach ihm im Laufe der letzten Jahre erschienen sind und sich der neuen Methodik bedienen.

Von der großen Zahl von Vitalfärbungsarbeiten seien hier nochmals besonders die hervorragenden Arbeiten Aschoffs genannt, die er von seinen Schülern Suzuki und Kiyono ausführen ließ. Hingewiesen sei ferner auf die ausgezeichnete Bearbeitung, die das Vitalfärbungsproblem neuerdings durch v. Möllendorff gefunden hat.

Welche Fülle neuer Tatsachen die Anwendung des Vitalfärbungsproblems ergibt auf fast allen Gebieten medizinischer Wissenschaft, geht daraus von neuem hervor. Der Grund hierfür ist darin zu suchen, daß

1. die Ablagerung der sauren Farbstoffe parallel geht der Verteilung vieler Stoffe und Stoffwechselprodukte im gesunden und kranken Organismus,

2. durch die Vitalfärbung Zellen differenziert werden, die für physiologische wie pathologische Vorgänge im Körper von ungeheurer Wichtigkeit sind,

3. die Methode Einblicke in Vorgänge im lebenden Tier gestattet, die mit anderen Methoden gar nicht oder nur unvollkommen erreicht werden können.

Aus der Zahl der Probleme, zu deren Lösung die Vitalfärbung beigetragen hat oder von denen zu erwarten ist, daß sie beitragen wird, seien im folgenden einige angedeutet:

Auf dem Gebiete der normalen wie pathologischen Anatomie hat die Vitalfärbung sich besonders in der Histologie des Blutes und Bindegewebes als Forschungsmethode bewährt. Ich erinnere besonders an Aschoffs Untersuchungen über die Histiocyten, deren Genese und weiteres Schicksal von ihm klarer als von anderen Autoren präzisiert worden ist. Welche Wichtigkeit gerade diese Frage hat, geht aus Ergebnissen von Versuchen hervor, die das Verhalten der Blut- und Bindegewebszellen bei physiologischen und pathologischen Vorgängen, wie z. B. Involution des Ovariums, Gravidität, Wundheilung im weitesten Sinne des Wortes, Entzündung usw. zum Gegenstand haben. Auch bei anderen pathologischen Vorgängen ist die Vitalfärbung berufen, wichtige Aufschlüsse zu geben. Die Anschauungen über die den Tuberkel bildenden Zellen bei der Tuberkulose sind fester gegründet worden, die celluläre Abwehrreaktion des Organismus bei der Infektion mit Eitererregern wurde von neuem mit Erfolg untersucht. Die Methode gab ferner einen Einblick in die feineren Vorgänge bei der Vergiftung eines Tieres durch die verschiedensten Chemikalien wie Cumarin, Kokain, Chloroform, Phosphor, Uran, Sublimat usw. Namentlich liegen bezüglich der Pathologie der Niere eingehende Untersuchungen vor. Interessante Einblicke gewährte die Vitalfärbung in die Biologie der bösartigen Geschwülste und noch viele andere pathologische Vorgänge.

Ein Schritt von wahrscheinlich weittragender Bedeutung im besonderen für die Hämatologie und die Bindegewebslehre ist kürzlich von v. Möllendorff gemacht worden, dem es zum ersten Male gelang, embryonale Zellen (Froschlarven) mit sauren Farbstoffen vitalzufärben, nachdem Hoffmann gezeigt hatte, daß embryonale Zellen in Gewebskulturen die Färbung annehmen.

Aber nicht nur für die histologische anatomisch-pathologische Forschung, sondern auch für physiologische und pharmakologische Probleme ist die Vitalfärbung von Bedeutung. Sie ge-

stattet manchen Einblick in die Vorgänge des Stoffwechsels im Organismus und die in den Zellen selbst unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Wahrscheinlich wird es möglich sein, besonders über den Fett- und Eiweißstoffwechel ein klares Bild zu gewinnen, namentlich der niedrigeren Eiweißabbauprodukte wie der Peptone, die in physikochemischer Hinsicht mit den sauren Farbstoffen manche Ähnlichkeit zeigen. Die Lehre von den „Zellgranula" muß in einem neuen Licht erscheinen. Namentlich halte ich es für wahrscheinlich, daß die Chondriosomen, Mitochondrien mancher Zellarten usw. sich als gespeicherte Eiweißstoffwechselprodukte und nicht als Zellorganula entpuppen werden.

Andere bei pathologischen Vorgängen im Körper auftretende Substanzen, wie Cholesterin, zeigen bemerkenswerte Analogien mit der Vitalfärbung (Aschoff, Anitschkow), ferner die Harnsäure (ich hatte Eckert zu Versuchen in dieser Richtung angeregt, die leider über die allerersten Anfänge nicht herausgekommen sind[1]), die Gallenfarbstoffe bei Ikterus (Kiyono), der Kohlenstoff bei Anthrakosis.

Endlich sei nochmals auf die Physiologie der Harnbereitung hingewiesen, wo die Vitalfärbung ja schon seit langen Jahren eine wichtige Forschungsmethode darstellt.

Auf pharmakologischem Gebiet ist die Vitalfärbung mit sauren Farbstoffen nach vielen Richtungen von Bedeutung.

Sie muß notwendig zu einer Revision der heutigen Anschauungen der Seitenkettentheorie führen, sie gestattet einen Einblick in die Verteilung einer Gruppe von Stoffen im Organismus und lehrt uns deren Gesetze kennen, um vielleicht im Zusammenhang mit den pathologisch-histologischen Arbeiten neue Wege für die Synthese spezifisch wirkender Arzneistoffe zu weisen. Die Pharmakologie der Kolloide erfährt durch die Untersuchungen mit Vitalfarbstoffen eine Erweiterung.

Für toxikologische Untersuchungen gibt die Vitalfärbung die Möglichkeit, bereits feinere Schädigungen vieler Zellen zu erkennen und besonders in den Organen die durch die Vergiftung getöteten Zellen von den ungeschädigten im histologischen Präparat auseinanderzuhalten.

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **74**. 1913.

Ein Beitrag zur Biochemie der Pflanzen.

Von

A. Stutzer (Godesberg).

(Eingegangen am 5. Dezember 1916.)

Nach einer weitverbreiteten Ansicht ist die Reaktion des Bodens, in dem unsere Kulturpflanzen wachsen, neutral, wenn wir vom Moorboden, von schlecht durchlüfteten Wiesenböden und von solchen Ackerböden absehen, die durch das Wachstum größerer Mengen bestimmter Pflanzen, z. B. von Rumexarten gekennzeichnet sind.

Diese Ansicht ist nicht zutreffend. Wirklich neutral reagierende Böden kommen viel seltener vor als solche, die entweder eine deutlich alkalische oder saure Reaktion haben. Wir wissen aus der Bakteriologie, daß gewisse Arten von Bakterien eine stark alkalische Reaktion des Nährbodens bevorzugen, andere bei nahezu neutraler Reaktion sich gut entwickeln, dagegen die Schimmelpilze bei Gegenwart von freien Säuren am besten gedeihen.

Die verschiedenen Arten der höheren Pflanzen stellen in ähnlicher Weise sehr ungleiche Ansprüche an die Reaktion des Bodens, jedoch ist dies Gebiet (unter Beachtung des durch die Analyse genau festgestellten Gehaltes des Bodens an freiem Alkali bzw. an Säure) noch wenig erforscht. Der Landwirt gebraucht zwar seit langer Zeit gebrannten Kalk oder Mergel zur Verbesserung des „sauren“ Bodens, meist jedoch aus dem Grunde, um die kolloidalen Eigenschaften des Ackerbodens zu ändern, seltener deshalb, um dem Boden den Pflanzennährstoff „Kalk“ zuzuführen. Bei Mineralböden scheint das Vorhandensein von Säure für das Wachstum der Kulturpflanzen weniger schädlich zu sein, als ein größerer Gehalt an freiem Alkali. Im Gärtnereibetriebe ist es üblich, den in Töpfen zu kultivierenden

Pflanzen einen Boden darzubieten, der bald größere, bald geringere Mengen von sauer reagierenden Humusstoffen enthält. Es ist eine bekannte Tatsache, daß unter gewissen Voraussetzungen im sauren Moorboden landwirtschaftliche und gärtnerische Kulturpflanzen zu recht guter Entwicklung gebracht werden können.

In ganz anderer Weise verhalten sich die Kulturpflanzen, wenn der Boden eine größere Menge von freiem Alkali enthält. Soweit mir bekannt, wurde zuerst durch die landwirtschaftliche Versuchsstation in Bernburg (von Hellriegel, Wilfarth, Krüger, Wimmer) nachgewiesen, daß bei alkalischer Reaktion des Bodens bei den Zuckerrüben die Herz- und Trockenfäule auftritt, bei Hafer die Dörrfleckenkrankheit, die eine sehr weite Verbreitung gefunden hat, indes sehr wahrscheinlich nur bei alkalischer Reaktion des Bodens, in dem die Haferpflanzen wachsen, vorkommt.

Über einige Gartenpflanzen teile ich folgende Beobachtungen mit: Die bekannte Syringa vulgaris wuchs in den benachbarten Gärten sehr kümmerlich, auf den Blättern waren große rote Flecke vorhanden, ähnlich denjenigen Flecken, die sich bilden, wenn Pflanzen durch saure Gase geschädigt werden. Das Vorhandensein saurer Gase war im vorliegenden Falle vollkommen ausgeschlossen.

In meinem neu angelegten Garten pflanzte ich kräftige, bisher stets gesund gewesene Syringen. Sie wurden krank, auf den Blättern bildeten sich große rote Flecke. Die Untersuchung des Bodens, der aus der Umgebung der Wurzeln einer besonders stark geschädigten Syringe entnommen war, ergab, daß in 1 kg des trocknen Bodens 0,88 g freies Alkali in wasserlöslichem Zustande vorhanden waren. Das freie Alkali mußte nachteilig gewirkt haben.

In dem Garten wurden sehr verschiedene Sorten von Rosen gepflanzt. Die Pflanzen waren beim Einpflanzen vollkommen gesund, gewisse Arten wurden in der Folgezeit von Meltau stark befallen und entwickelten sich nur kümmerlich. Andere Pflanzen, wie Lathyrus odoratus, Reseda, Tropäolum usw. wuchsen in demselben Boden sehr gut.

Bei einigen hochstämmigen Rosen nahm ich die Erde bis zur Hauptwurzel vorsichtig heraus und ersetzte sie durch Torf-

mull, der im lufttrocknen Zustande in 1 kg 16,6 g Säure (auf H_2SO_4 berechnet) enthielt. Die durch Meltau befallenen Blätter wurden abgeschnitten. Niedrige Rosen nahm ich ganz aus der Erde heraus, sie wurden stark zurückgeschnitten und die Wurzeln in ein Gemenge von Torfmull mit wenig Erde eingebettet. Stets ist der Boden mit den nötigen Nährstoffen neu gedüngt. In allen Fällen zeigten die Rosen jetzt ein freudiges Wachstum, sie bildeten viele neue Blätter, der Meltau war spurlos verschwunden.

Hiernach dürfte es sowohl im landwirtschaftlichen wie auch im gärtnerischen Betriebe sehr wichtig sein, die Reaktion des Bodens zu kennen, insbesondere bei der Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten. Ich frage: Steht beispielsweise das Vorkommen von Perenospora in irgendwelchen Beziehungen zur Reaktion des Bodens in ähnlicher Weise wie das Auftreten der Dörrfleckenkrankheit des Hafers, der Herz- und Trockenfäule der Zuckerrüben oder der Krankheiten, die ich vorstehend für Syringen und Rosen erwähnte?

Ich habe aus Weinbergen, in denen Oidium und Perenospora seit langer Zeit stark aufgetreten sind, die Feinerde untersucht und gefunden, daß 1 kg der trocknen Feinerde durchschnittlich 0,5 g in Wasser lösliches Alkali enthält, d. h. alkalisch reagierende Substanz.

Am sogenannten Vorgebirge bei Bonn tritt der Stachelbeermeltau teilweise recht stark auf. Ich entnahm aus einer größeren Plantage Erdproben und stellte fest, daß 1 kg der trocknen Feinerde 0,88 g alkalisch reagierende Substanz enthält.

Nach meiner Ansicht ist es bei pflanzenpathologischen Untersuchungen durchaus nötig, auf die Reaktion des Bodens Rücksicht zu nehmen. Das Beobachtungsmaterial, das bisher in dieser Hinsicht vorliegt, ist recht dürftig. Sache der pflanzenphysiologischen Versuchsstationen wird es sein, hierüber Aufklärung zu schaffen.

Eine willkürliche Änderung der Reaktion des Bodens, z. B. bei der Bekämpfung von häufig auftretenden Pflanzenkrankheiten, wird im gärtnerischen Betriebe leichter als im landwirtschaftlichen möglich sein. Wichtig ist es auch, darüber Aufklärung zu suchen, bei welchem Gehalte des Bodens an freiem Alkali oder Säure die einzelnen Arten von gesunden

Kulturpflanzen am besten gedeihen. Die diesbezügliche Erweiterung unserer Kenntnisse würde von großer Bedeutung für die landwirtschaftliche Praxis sein. Ich habe einige Beobachtungen bei wild wachsenden Pflanzen gemacht, über die ich nachstehend kurz berichte.

Auf einem Felde fand ich eine fast vollständige Reinkultur der Ackerdistel (Cirsium arvense). Die Untersuchung des Bodens ergab, daß in 1 kg der trockenen Feinerde 0,98 g in Wasser lösliche, alkalisch reagierende Substanz enthalten waren. Diese Zahl ist sehr hoch. Der in einer anderen Gegend von einem Distelfelde entnommene Boden hatte 0,90 g alkalisch reagierende Stoffe. Es würde nachzuforschen sein, ob diese Distelart allgemein die alkalische Reaktion des Bodens bevorzugt, oder ob meine Beobachtungen nur zufällige sind. Der Landwirt kennt gewisse Pflanzenarten, deren Vorkommen anzeigt, daß der Boden sauer ist, aber er weiß bisher nichts von Pflanzen, die eine alkalische Reaktion wahrscheinlich machen. Zu den sauren Pflanzen rechnet man beispielsweise Sauerampfer (Rumex) und Schachtelhalm (Equisetum). Die Untersuchung der Erde eines Feldes, auf dem viel Rumex war, ergab 0,34 g Säure in 1 kg der trockenen Feinerde. Der Boden, in dem Equisetum silvaticum auffallend gut gedieh, hatte 0,51 g Säure.

Einen wesentlich höheren Säuregehalt hatten Waldböden, in denen Farnkräuter wuchsen. Boden aus der Umgebung der Wurzeln von Aspidium filis mas entnommen, hatte 3,74 g Säure und ein Boden, in dem Pteridium aquilinum $1^1/_2$ m hoch entwickelt war, enthielt 3,85 g Säure in 1 kg der trockenen Feinerde eines fast humusfreien Mineralbodens.

Der Landwirt hält das üppige Wachstum gewisser Riedgräser (Cyperaceen) und Binsen (Juncaceen) für ein sicheres Zeichen, daß der betreffende Boden sauer und für gute Gräser nicht geeignet ist. Es wird geraten, einen solchen Boden mit gebranntem Kalk oder mit Mergel zu bestreuen, um die Säure des Bodens zu neutralisieren. Nach meinen Untersuchungen ist ein solcher Boden nicht selten neutral oder sogar alkalisch. Jedenfalls müssen die Beziehungen jener Pflanzen zur Reaktion des Bodens noch näher aufgeklärt werden, da es eine falsche Maßnahme sein würde, einem nicht alkalisch reagierenden Boden Ätzkalk oder Calciumcarbonat

zuzuführen. Abgesehen von dieser praktischen Bedeutung hat es ein wissenschaftliches Interesse, die Beziehungen der Reaktion des Bodens (also des Gehaltes an freier Säure bzw. an freiem Alkali) zur Entwicklung der verschiedenen Pflanzenarten näher kennen zu lernen, und teile ich nachstehend mit, in welcher Weise von mir der Gehalt an Säure und Alkali quantitativ bestimmt wird.

Im Band 69, S. 305 bis 308 dieser Zeitschrift habe ich Angaben gemacht über „die Bestimmung sehr geringer Mengen von freien Säuren oder alkalisch reagierenden Stoffen in Flüssigkeiten vegetabilischen oder animalischen Ursprungs". Baumann und Gully hatten schon früher das Prinzip jener Methode bei der Untersuchung von Boden angewendet, ich habe in letzter Zeit das Verfahren weiter ausgebildet.

Prinzip des Verfahrens.

Bringt man eine saure Substanz mit einer Lösung von Kaliumjodat und Kaliumjodid zusammen, so vereinigt sich die Säure mit Kalium, vorübergehend entsteht ein Gemenge von HJ und HJO_3; dieses wird aber sofort unter Freiwerden von Jod nach der Gleichung zerlegt: $HJO_3 + 5\ HJ = J_6 + 3\ H_2O$. Das frei gewordene Jod wird durch Natriumthiosulfat titriert unter Gebrauch von Stärkelösung als Indicator.

Reagiert der Boden alkalisch, so gibt man zu dem wäßrigen Auszuge des Bodens eine bestimmte Menge von Schwefelsäure, dessen Titer auf Natriumthiosulfat eingestellt ist und ermittelt in gleicher Weise durch Titration die Menge des frei gewordenen Jods. 127 J zeigen an 40 NaOH oder 56 KOH oder 49 H_2SO_4.

Lösungen.

Alle Lösungen werden mit destilliertem Wasser hergestellt, das durch Erhitzen bis zum Sieden von Kohlensäure zuvor befreit wurde. Auch bei Herstellung des wäßrigen Auszuges des Bodens muß man von Kohlensäure befreites Wasser nehmen.

I. Kaliumjodid. 80 g KJ werden zu 1 Liter gelöst.
II. Kaliumjodat. 20 g KJO_3 werden zu 1 Liter gelöst.
III. Stärkelösung jedesmal frisch bereitet.

IV. Titrierte Schwefelsäure $^n/_{100}$.

V. Natriumthiosulfat $^n/_{100}$. 2,48 g $Na_2S_2O_3 + 5\,H_2O$ in 1 Liter gelöst.

Die Lösungen IV und V werden aus vorrätiger $^n/_{10}$-Lösung durch Verdünnen mit Wasser hergestellt. Die Thiosulfatlösung muß häufiger frisch bereitet werden. Ihr Verhältnis zur Schwefelsäure wird jedesmal durch einen blinden Versuch ermittelt.

Qualitative Prüfung des Bodens.

Von dem zu prüfenden Boden ist eine gute Mittelprobe zu entnehmen. Es würde mich zu weit führen, wenn ich angeben wollte, in welcher Weise dies am besten geschieht. Die im Laboratorium eingelieferte Probe wird lufttrocken gemacht, indem man sie in dünner Schicht ausgebreitet mehrere Tage lang liegen läßt, oder man trocknet sie bei einer 100° nicht überschreitenden Temperatur in einem größeren Trockenschrank. Dann wird die Erde in einer Reibschale zerdrückt und nur derjenige Anteil verwendet, der durch ein Sieb von 0,5 mm Lochweite gebracht war. Von diesem nimmt man ungefähr 5 g, übergießt die abgewogene Menge mit 50 ccm destillierten Wassers, das durch Auskochen von Kohlensäure befreit und dann wieder kalt geworden war, und mit je 10 ccm der Lösungen von Kaliumjodid und Jodat. Die Mischung wird gut umgeschüttelt, nach einer Viertelstunde die Flüssigkeit abfiltriert und mit frisch bereitetem Stärkekleister versetzt. Blaufärbung zeigt Säure an. Bleibt die Farbe unverändert, so ist der Boden in der Regel alkalisch, seltener völlig neutral.

Quantitative Bestimmungen.

Früher verfuhr ich in der Weise, daß ich 40 g von dem zu untersuchenden Boden in einer Flasche von 500 ccm Rauminhalt mit 400 ccm Flüssigkeit übergoß und in einem Rotier- oder Schüttelapparat 30 Minuten lang schüttelte. Die für Massen-Analysen in agrikultur-chemischen Laboratorien gebräuchlichen Schüttelapparate sind meistens zur Aufnahme solcher Gefäße eingerichtet, deren Rauminhalt 1 Liter nicht übersteigt. Ich glaubte, diesen Verhältnissen mich anpassen zu sollen und einen konzentrierten Auszug aus dem Boden herzustellen, indem ich als Verhältnis von Boden zur Flüssigkeit 1 : 10 nahm.

Inzwischen habe ich erkannt, daß viel größere Unterschiede im Gehalt an Säure und an freiem Alkali hervortreten, wenn man das Verhältnis vom Boden zur Flüssigkeit auf 1 : 50 erweitert. Dies geht aus folgenden Zahlen hervor:

Boden Nr.	Die Analyse ergab, daß in 1 kg des lufttrockenen Bodens folgende Mengen an Säure bzw. Alkali enthalten waren, wenn das Verhältnis von Boden zur Flüssigkeit bei der Herstellung des Auszuges gewählt wurde, wie	
	1 : 10	1 : 50
1	0,37 g	0,98 g freies Alkali
2	0,45 „	0,90 „ „ „
3	0,26 „	0,88 „ „ „
4	0,24 „	0,34 „ Säure
5	0,36 „	0,51 „ „
6	2,35 „	3,85 „ „
7	1,70 „	3,74 „ „

Wollte man das Verhältnis bei der Herstellung des Auszuges wie 1 : 100 wählen, so würden noch größere Unterschiede zu beobachten sein. Im vorliegenden Falle handelt es sich nicht darum, die absolute Menge von Säure oder Alkali zu ermitteln, da diese um so größer ist, je mehr von dem Lösungsmittel gebraucht wird. Ich beabsichtige nur, eine durch Übereinkunft festzulegende Methode anzugeben, bei deren genauer Befolgung man bestimmte, zahlenmäßige Ausdrücke dafür erhält, ob ein Boden wenig oder viel Säure, bzw. wenig oder viel freies Alkali hat.

Die Ermittlung des Säuregehaltes.

Es sei nochmals darauf hingewiesen, daß das destillierte Wasser, das zur Bereitung der Salzlösungen oder des Bodenauszuges verwendet wird, durch Auskochen von gelöster Kohlensäure befreit sein muß. Man benutzt das Wasser, nachdem es dann auf ungefähr 20° wieder erkaltet ist.

Von dem zu untersuchenden Boden werden 10 g in eine Maßflasche von 500 ccm Rauminhalt gebracht, je 25 ccm der Kaliumjodid- und der Kaliumjodatlösung daraufgegossen und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Mischung wird 30 Minuten lang in einem Rotierapparat geschüttelt und die Flüssigkeit dann durch ein Filter von 12 bis 15 cm

Durchmesser abfiltriert. Die ersten 75 bis 100 ccm des Filtrates fängt man gesondert auf und beseitigt sie, weil die Fasern des Filtrierpapiers eine kleine Menge von freigewordenem Jod absorbieren. Von dem übrigen Filtrat nimmt man 250 ccm (entsprechend 5 g des ursprünglichen Bodens), setzt frisch bereitete Stärkelösung hinzu und titriert mit Natriumthiosulfat $^n/_{100}$, bis die blaue Farbe der Jodstärke verschwunden ist.

Durch einen blinden Versuch überzeugt man sich jedesmal, ob 25 ccm $^n/_{100}$-Schwefelsäure = 25 ccm $^n/_{100}$-Thiosulfatlösung entsprechen, nachdem man die Schwefelsäure mit Kaliumjodid- und Jodatlösung und mit Stärkekleister vermischt hatte.

Das Thiosulfat setzt mit freiem Jod nach folgender Gleichung sich um: $2\,Na_2S_2O_3 + J_2 = 2\,NaJ + Na_2S_4O_6$. Wirkt Säure auf das Gemenge von Kaliumjodat und Jodid ein, so machen 6 Wasserstoffionen der Säure 6 Jod frei.

$$3\,H_2SO_4 + KJO_3 + 5\,KJ = 3\,K_2SO_4 + HJO_3 + 5\,HJ.$$
$$HJO_3 + 5\,HJ = J_6 + 3\,H_2O.$$

Hierbei ist vorausgesetzt, daß in dem Erdauszuge andere jodabsorbierende Stoffe (Arsentrioxyd, Antimonoxyd, Schwefeldioxyd, Ferrisalze usw.) nicht zugegen sind. Ferrisalze werden nicht oder nur selten im Ackerboden vorhanden sein. Eisenoxyd beeinträchtigt die Analyse nicht. Ein saurer Mineralboden hatte nach Beimengung von 20% Eisenoxyd denselben Säuregehalt, als ohne Zusatz von Fe_2O_3.

Berechnung. 1 ccm der $^n/_{100}$-Thiosulfatlösung zeigt an: 0,00127 g Jod oder 0,00001 Wasserstoffion einer Säure oder 0,00049 g Schwefelsäure. Da wir das Molekulargewicht der im Boden enthaltenen Säuren nicht kennen, beziehe ich den Verbrauch an Thiosulfat auf H_2SO_4 und gebe an, wieviel Gramm Säure in 1 kg des untersuchten lufttrockenen Bodens enthalten ist.

Bei der Titration wurden die löslichen Bestandteile von 5 g Boden verwendet, somit zeigt jeder verbrauchte Kubikzentimeter der Thiosulfatlösung 0,098 g Säure in 1 kg Boden an ($0{,}00049 \cdot 200 = 0{,}098$).

Die Ermittelung des Alkaligehaltes.

Die Behandlung des Bodens mit der Kaliumjodid-Jodatlösung geschieht in derselben Weise, wie sie vorstehend für die Säurebestimmung angegeben ist. 250 ccm des Filtrates (entsprechend 5 g des Bodens) versetzt man mit frisch bereiteter Stärkelösung und mit 25 ccm $^{n}/_{100}$-Schwefelsäure. Man titriert mit Natriumthiosulfat $^{n}/_{100}$, bis die blaue Farbe der Jodstärke verschwunden ist. Bei der Berechnung sind die verbrauchten Kubikzentimenter der Thiosulfatlösung von 25 ccm $^{n}/_{100}$-Schwefelsäure abzuziehen. Die Differenz gibt an, wieviel ccm $^{n}/_{100}$-Schwefelsäure zur Neutralisierung des in 5 g Boden enthaltenen freien Alkalis nötig waren. Wir wissen nicht, welches Alkali vorhanden ist. Wollten wir es als NaOH zum Ausdruck bringen, so würde jeder Kubikzentimeter der $^{n}/_{100}$-Schwefelsäure = 0,00040 g NaOH entsprechen. Als KOH dagegen 0,00056 g KOH. Das Mittel beider Werte ist ungefähr der Zahl für Schwefelsäure gleich (0,00049), und empfiehlt es sich, die Alkalität in der Weise zum Ausdruck zu bringen, daß für jeden Kubikzentimeter der verbrauchten Schwefelsäure 0,00049 g Alkali angenommen wird. Zur Umrechnung auf 1 kg Boden haben wir den gleichen Faktor wie vorhin angegeben zu benutzen, bei der Titration entspricht jeder Kubikzentimeter der Schwefelsäure 0,098 g Alkali in 1 kg Boden.

Die proteolytischen Enzyme der Pinguicula vulgaris.

Von

K. G. Dernby.

(Aus dem Nobelinstitut für physikalische Chemie zu Stockholm.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1916.)

Die Pinguicula vulgaris gehört bekanntlich zu den insektenfressenden Pflanzen, und in diesen muß man ja das Vorhandensein von proteolytischen Enzymen vermuten, die das aufgenommene Eiweiß verdauen. So z. B. hat J. White[1]) in der Drosera ein pepsinähnliches Enzym gefunden, das in saurer Lösung koaguliertes Eiweiß und Fibrin auflöst, dagegen aber keine von Trypsin- oder Erepsin-Charakter. Meines Wissens gibt es in der biochemischen Literatur keine diesbezüglichen Angaben über Untersuchungen betreffend Pinguicula[2]).

Sowohl die Pinguicula als die Drosera kommen ziemlich allgemein in ganz Skandinavien vor, und nach einem allgemein verbreiteten Volksglauben bewirken die schleimigen Blätter in Berührung mit Milch, daß diese in einer besonderen „langen" Form koaguliert, d. h. sehr viscos wird. Doch hat es nach Untersuchungen von Frl. Troili-Pettersson und Olsen-Sopp[3]) den Anschein, als sei dies nicht zutreffend und als habe die in Skandinavien vielgebrauchte Dickmilch — „långmjölk" — mit Pinguicula oder Drosera nichts zu schaffen.

---

[1]) J. White, Proc. Roy. Soc. **88**, 1910. London.

[2]) Die einzige Arbeit hierüber stammt von einem belgischen Forscher, Morren, her (Bull. de l'Acad. scienc. Belg. I[e] Ser. **39**, **40**, **42**, 1875/76), aber diese kann nur als qualitativ bezeichnet werden. Sein großes Verdienst ist doch, daß er die Meinung energisch vertreten hat, daß es sich bei den insektenfressenden Pflanzen um eine enzymatische Verdauung und nicht um eine Bakterienwirkung handelt.

[3]) Olsen-Sopp, Centralbl. f. Bakt. **33**, II. Abt., 1912.

Doch hat, wie im folgenden gezeigt werden wird, der Preßsaft aus Pinguiculablättern eine besondere Einwirkung auf süße Milch und namentlich auf das Casein derselben. Die richtige Dickmilch soll ein wenig gegoren sein und eine schwach saure Reaktion aufweisen. Bei der Behandlung von süßer Milch mit Pinguiculaextrakt erhält man freilich eine viscose Flüssigkeit, aber von alkalischer Reaktion, und das Casein in derselben ist nicht koaguliert, sondern in einfachere Körper gespalten.

Etwa $^1/_2$ kg zerpflückte Pinguiculablätter (die Pflanze hatte soeben angefangen zu blühen) wurden mit Glycerin und etwas Chloroform übergossen und 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Hierbei dürfte vollständige Plasmolyse eingetreten sein. Hierauf wurde die durch gelöstes Chlorophyll etwas grünbraun gefärbte Flüssigkeit durch ein Siebtuch ausgepreßt und in einen Dialysator mit Kollodiummembran gebracht und 4 Tage lang dialysiert, bis alles Glycerin wegdialysiert war.

Die dialysierte Flüssigkeit wurde im Eisschrank mit Chloroform als Antisepticum aufbewahrt und dann als Enzympräparat angewendet.

Das Enzympräparat enthielt nur 1 bis 1,2 mg Stickstoff pro 10 ccm, also waren von 500 g frischen Blättern nur ca. 10 mg Totalstickstoff in Lösung gegangen.

Der Preßsaft war sowohl vor als auch während und nach der Dialyse vollständig neutral ($p_H = 6{,}8 - 7$, wo p_H den Wasserstoffionenexponenten bedeutet[1]).

Das Enzympräparat wurde nach ganz derselben Methode hergestellt, die ich bei der Arbeit mit den proteolytischen Enzymen der Hefe angewendet habe und die in einer früheren Abhandlung ausführlich beschrieben ist[2]). Bei dieser Arbeit ging hervor, daß im Preßsaft teils Enzyme von Pepsin, teils solche von Erepsincharakter zu finden waren.

Um auszuprobieren, ob im Pinguiculaextrakt pepsinähnliche Enzyme vorhanden seien, wurde folgender Versuch gemacht: zu 20 ccm Acidalbumin (aus Hühnereiweiß und Salzsäure) wurden 10 ccm Enzymlösung zugesetzt und das Ganze auf

[1]) p_H bezeichnet nach Sörensen (diese Zeitschr. 21, 131, 1909) den Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration, z. B. bedeutet $p_H = 7{,}8$, daß die Wasserstoffionenkonzentration $10^{-7{,}8}$ ist.

[2]) Dernby, Medd. fr. K. Vet. Ak. Nobelinstitut 3, 14, 1916.

100 ccm verdünnt. Die Mischung, die mit Chloroform versetzt wurde, wurde in einem Erlenmeyer-Kolben in einen Wasserthermostat bei 38° gestellt. In einer Probe war die Wasserstoffionenkonzentration $10^{-5,5}$, in einer zweiten $10^{-6,2}$ und in einer dritten $10^{-7,5}$. Die Acidalbuminlösung enthielt pro Kubikzentimeter 10,5 mg Totalstickstoff. Nach gewissen Zeiten wurden Proben für Formoltitrierung entnommen, aber sie fielen sämtlich negativ aus, nicht einmal nach 4 Tagen war etwas vom Eiweiß gespalten.

Ebenso, wie nachstehend gezeigt werden wird, war das Pinguiculaextrakt nicht imstande, in saurer Lösung koaguliertes Casein aufzulösen. Es scheint demnach, als seien keine pepsinähnlichen Enzyme in dem in dieser Weise bereiteten Preßsaft vorhanden. Hiermit ist jedoch allerdings nicht bewiesen, daß solche im Pinguiculaextrakt nicht existieren sollten.

Leider hatte ich keine Gelegenheit, das Verhalten des Pinguiculaextraktes gegen Thymolgelatine, d. h. bei welchen Wasserstoffionenkonzentrationen die Verflüssigung am schnellsten verläuft, zu untersuchen. Dies werde ich aber später vornehmen, und zwar mittels der vorzüglichen Versuchsanordnungen von Palitzsch und Walbum[1]).

Um das Vorhandensein von erepsinähnlichen Enzymen zu konstatieren, wurde die Einwirkung des Pinguiculcextraktes auf Glycylglycinlösungen bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen erprobt. Die Versuchsmethodik war ganz dieselbe wie die in der oben erwähnten Abhandlung beschriebene. Die Versuchsflüssigkeit bestand aus: 10 ccm 0,5 n-Glycylglycin + $\frac{n}{5}$ Natronlauge (so viele Kubikzentimeter, daß die erwünschte Wasserstoffionenkonzentration erreicht wurde) + 30 ccm Enzymlösung + chloroformhaltiges Wasser = 100 ccm. Die diese Flüssigkeit enthaltenden Kölbchen wurden in einen Wasserthermostat bei 38° gesenkt. Nach gewissen Zeiten wurden 15 ccm der Flüssigkeit herauspipettiert und der Aminostickstoff durch Formoltitration bestimmt. Die Wasserstoffionenkonzentration entsprach in den fünf Versuchen resp. p_H = 6, 7, 7,5, 8, 8,5.

[1]) Palitsch und Walbum, diese Zeitschr. 47, 1, 1912.

Das Resultat fiel in sämtlichen Fällen vollständig negativ aus, nicht einmal nach 4 Tagen war in einem der Fälle Aminostickstoff freigemacht worden.

Erepsinähnliche Enzyme schienen demnach in diesem Pinguiculaextrakt nicht vorzukommen.

Dagegen stellte sich heraus, daß dieser Preßsaft eine unzweifelhaft proteolytische Einwirkung auf Pepton- und Caseinlösungen hatte. In Tabelle I sind einige Versuche mit Peptonlösungen bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen angegeben. Die Versuche sind in derselben Weise wie die früheren mit Acidalbumin und Erepsin angestellten.

Tabelle I.

20 ccm Peptonlösung (6,3 mg Totalstickstoff pro Kubikzentimeter enthaltend) + $^n/_5$-NaOH (resp. HCl) + 10 ccm Enzymlösung + chloroformhaltiges Wasser = 100 ccm. $t = 38°$.

Nach Stunden	Freigemachter Aminostickstoff pro 100 ccm				
	a Ohne Enzymzusatz $p_{H'} = 8$ mg	b $p_{H'} = 6$ mg	c $p_{H'} = 7$ mg	d $p_{H'} = 8$ mg	e $p_{H'} = 9$ mg
0	0	0	0	0	0
20	—	1,4	1,4	4,2	4,2
48	0	5,6	5,1	8,4	7,0

Die Formoltitrierung wurde in 20 ccm der Probe ausgeführt. Da die ganze Lösung 126 mg Totalstickstoff enthielt, wovon schon ursprünglich 18,2 Aminostickstoff war, sind ja die Mengen durch das Enzym freigemachter Stickstoff, im günstigsten Fall (d) 8,4 mg, besonders klein, aber doch deutlich bemerkbar. Daß es sich hier nicht um eine Bakterienwirkung gehandelt hat, zeigt der Kontrollversuch (a), wo kein Enzym zugesetzt war und wo sich auch kein neuer Aminostickstoff gebildet hatte.

Aus der Tabelle ist auch deutlich ersichtlich, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration um $p_{H'} = 8$ liegt, d. h. das Enzym wirkt am stärksten in schwach alkalischer Lösung und bei ungefähr derselben Wasserstoffionenkonzentration wie Trypsin.

Der Versuch zeigt doch deutlich, daß im Pinguiculasaft proteolytische Enzyme enthalten sind, die imstande sind, Pepton zu spalten.

Von größerem Interesse ist die Einwirkung des Pinguiculaextraktes auf Milch, oder richtiger gesagt auf das Casein derselben. In erster Linie sei bemerkt, daß in keinem Falle, weder bei 18° noch bei 38° das Pinguiculaextrakt imstande war, die Milch „dick" zu machen. Dagegen stellte sich heraus, daß von Fett befreite Milch, an und für sich von neutraler Reaktion, mit etwas Enzymlösung und einigen Tropfen Chloroform versetzt, nach einiger Zeit stark alkalisch wurde (p_H = ca. 9), während gleichzeitig beträchtliche Mengen Aminostickstoff gebildet wurden, d. h. das Casein hatte eine Spaltung erlitten[1]). Dieser Vorgang war nicht von Fäulnisgeruch begleitet. Die Flüssigkeit war freilich viscoser als die ursprüngliche Milch, aber keineswegs „dick".

Um dieses näher zu untersuchen, wurden einige Versuche, die in Tabelle II zu sehen sind, vorgenommen. Die Caseinlösung wurde folgendermaßen hergestellt. Gewöhnliche süße Milch wurde während einer halben Stunde zentrifugiert, worauf die von Fett befreite Milch mit dem 4 fachen Volumen destillierten Wassers verdünnt wurde, worauf sie nach Zusatz von Chloroform im Eisschrank aufbewahrt wurde und mehrere Wochen haltbar war. Die hier angewendete in dieser Weise bereitete Lösung enthielt pro Kubikzentimeter 3,7 mg Totalstickstoff.

Tabelle II.

20 ccm Caseinlösung (3,7 mg Totalstickstoff pro Kubikzentimeter enthaltend) + $^n/_5$-NaOH (resp. HCl) + 20 ccm Enzymlösung + chloroformhaltiges Wasser = 100 ccm. t = 38°.

Nach Stunden	a Nur Casein + Wasser		b		c		d		e	
	mg N	p_H	mg N	p_H	mg N	p_H	mg N	p_H	mg N	p_H
0	0	7,2	0	5,5	0	7,0	0	8,0	0	9,0
48	—	—	0	5,5	5,6	7,2	19,8	8,4	16,8	9,3
64	0	7,2	—	—	7,6	7,3	—	—	—	—
360	0	7,2	0	5,5	13,2	8,0	23,5	9,0	20,0	9,5

(mg N = mg freigemachter Aminostickstoff pro 100 ccm.)

[1]) Bekanntlich zeigen die Spaltungsprodukte des Caseins eine starke alkalische Reaktion.

Ebenso wie vorher wurde in 20 ccm formoltitriert. Jede Probe enthielt pro 100 ccm, wie man sieht, 74 mg Totalstickstoff, wovon ca. 3 mg Aminostickstoff war; im günstigsten Fall (d) wurden 18 mg oder 25% des Totalstickstoffs gespalten. Die Enzymwirkung ist auch hier unwiderleglich.

Auch hier braucht man dank dem zugesetzten Chloroform keine Bakterienwirkung zu befürchten, wie dies auch die Kontrollprobe (a), wo keine Enzymlösung zugesetzt wurde, zeigt. Hier ist kein Aminostickstoff freigemacht worden. Ein Fäulnisprozeß ist nicht eingetreten, nicht einmal nach $>$ 360 Stunden war Geruch zu verspüren. Dies ist gewissermaßen bemerkenswert und verschieden von den Spaltungen mit Hefenereptase und Darmerepsin[1]), denn ein Teil der äußersten Spaltungsprodukte des Caseins, namentlich des Tryptophans[2]), kennzeichnen sich durch ihren charakteristischen Geruch. Möglicherweise kann dies so erklärt werden, daß das Pinguiculaenzym nicht wie die beiden anderen imstande ist, das Casein vollständig zu spalten.

In dem Fall b in Tabelle II, wo die Wasserstoffionenkonzentration $10^{-5,5}$ ($p_{H'} = 5{,}5$) war, fiel sogleich alles Casein aus, und nicht einmal nach 2 Wochen war etwas davon aufgelöst, was daraus hervorgeht, daß kein Aminostickstoff freigemacht war. Dieser Versuch, ebenso wie der zuvor erwähnte mit Acidalbumin, zeigt, daß in dem hier angewendeten Enzympräparat keine pepsinähnlichen Enzyme vorhanden waren.

In den Fällen c, d und e klärte sich die weiße Milchmischung allmählich und ging in eine schwach gelbe, nur ein wenig trübe Flüssigkeit über, nach 1 Tage in e, nach 2 in d und nach 4 Tagen in c. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß, wie aus Tabelle II in der Rubrik „$p_{H'}$" ersichtlich, je länger die Spaltung fortschreitet, um so mehr wird die Flüssigkeit alkalisch, und das Casein und dessen Spaltprodukte sind ja leicht löslich in alkalischen Flüssigkeiten.

Aus Tabelle II geht ferner hervor, daß die optimale Wasserstoffionenkonzentration des Pinguiculaenzymes bei $p_{H'} = 8$ bis 9 liegt, d. h. das Enzym ist am wirksamsten bei schwach alkalischer Reaktion des Mediums und gleicht hierin dem Trypsin.

[1]) Dernby, l. c.

[2]) Osborne und Guerst, Journ. of Biolog. Chem. 9.

Ich habe von allen Versuchen Abstand genommen, die Dissoziationsverhältnisse dieses Enzyms zu bestimmen, da die Enzymwirkung derartig gering war. Für genaue diesbezügliche Untersuchungen sind offenbar sehr große Mengen Pinguicula erforderlich.

Zusammenfassung.

1. Der dialysierte Preßsaft der Blätter von Pinguicula vulgaris hat nicht die Fähigkeit, die Milch „dick" zu machen.

2. Dagegen spaltet derselbe das Casein der Milch, aber nur zum Teil, bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion. Ebenso wird Witte-Pepton unter denselben Bedingungen gespalten.

3. Das hierbei wirksame proteolytische Enzym zeigt viele Ähnlichkeiten mit dem Trypsin. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration desselben liegt bei p_H = ca. 8. Ich schlage hier vor, daß man dieses Enzym Pinguiculatryptase nennt.

4. Es konnten hier keine Enzyme von Erepsin- oder Pepsincharakter in diesem Pinguicula-Preßsaft nachgewiesen werden.

Zur Frage der Konstitution des Amygdalins.

Von

Arminius Bau, Bremen.

(Eingegangen am 30. November 1916.)

Nach Emil Fischer[1]) ist das Amygdalin ein Derivat der Maltose oder eines ganz ähnlich konstruierten Zuckers. S. J. M. Auld[2]) äußerte die Ansicht, die im Amygdalin steckende Biose, ein Zucker der Formel $C_{12}H_{22}O_{11}$, sei ein noch unbekanntes α-β-Disaccharid.

Mit Hilfe quantitativer polarimetrischer Untersuchungen wiesen R. J. Caldwell und S. L. Courtauld[3]) nach, daß das Hefenenzym, das Amygdalin in Mandelnitrilglucosid und d-Glucose spaltet, von der Maltase verschieden ist. Sie nannten das neue Enzym Amygdalase, für welche die Zerstörungstemperatur zwischen 50° und 60°, also in der Nähe derjenigen der Maltase (55°) liegt, aber doch wohl einige Grade mehr als bei der letzteren betragen dürfte, denn wässerige Hefenauszüge, die infolge Erwärmens Maltose nicht oder kaum noch zerlegen, spalten dennoch das Amygdalin ziemlich stark.

Eine gewisse Unsicherheit über die Existenz der Amygdalase blieb aber doch bestehen, da die Zerstörungstemperaturen dieses Enzyms und der Maltase recht nahe beisammenliegen.

Deshalb stellte ich neue Versuche an, zu denen mir Paul Lindner (Berlin) den Saccharomycodes Ludwigii Hansen freundlichst zur Verfügung stellte.

Von den zahlreichen Untersuchungen, über die ich in der

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **27**, III, 2989, 1894; **28**, II, 1509, 1895. Vgl. auch diese Zeitschr. **73**, 352, 1916.

[2]) Nach dem Chem. Centralbl. **I**, 1698, 1907.

[3]) Proc. Roy. Soc. B, London **79**, 350, 1907.

Wochenschrift für Brauerei[1]) ausführlich berichtete, seien hier nur die ausschlaggebenden Versuche mitgeteilt.

1. Kleingärmethode nach Paul Lindner.

In den hohlen Objektträger kamen sterilisierte Amygdalinlösungen mit und ohne Hefenabkochung als Nährmittel, die dann mit S. Ludwigii geimpft und bei 31° aufbewahrt wurden.

In der folgenden Tabelle ist das Auftreten einer wahrnehmbaren Gärung mit +, einer deutlichen mit ++, einer starken mit +++ bezeichnet.

Amygdalinlösung in %	Beobachtungsdauer in Tagen		
	1	2	3
3 % ohne Nährlösung . .	++	+++	+++
3 „ mit „ . .	++	+++	+++
6 „ ohne „ . .	+	++	+++
7,42 „ mit „ . .	+++	+++	+++

Wir ersehen aus der Tabelle, daß in allen Fällen eine Gärung statthatte, und wenn dieselbe bei der 6%igen Amygdalinlösung anfangs schwächer verlief, so mag das vielleicht daran liegen, daß hier zufällig etwas weniger Hefe eingeimpft wurde.

2. Gärmethode nach Albert Jan Kluijver.

Zur Anwendung gelangten mit Nährstoffen versetzte Lösungen, die in 1 ccm 0,03 g und 0,07995 g Amygdalin enthielten. Die abgelesenen Kohlensäure-Volumina wurden auf 0° und 760 mm Barometerstand reduziert.

Da nach Kluijver[2]) 1 ccm der Flüssigkeit 1,2 ccm Kohlensäure gelöst enthält, wurde dieser Wert den abgelesenen und reduzierten Kubikzentimetern dieses Gases zugerechnet. Nach den Versuchen Kluijvers (Seite 73) entspricht 1 ccm gefundener Kohlensäure 4,0 mg d-Glucose.

Aus 511 Gewichtsteilen krystallisierten Amygdalins können im höchsten Falle 360 Gewichtsteile d-Glucose abgespalten werden.

Die angestellten Versuche sind nach der entsprechenden Berechnung in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

[1]) Wochenschr. f. Brauerei **34**, 29, 1917.

[2]) Biochem. Suikerbepalingen, Leiden **1914**, 69.

Angewandte Menge Amygdalin g	Dieser Menge entsprechende d-Glucose mg	Kohlensäure auf 0° und 760 mm Druck reduziert	Berechnet auf d-Glucose mg	Aufspaltung des Amygdalins %
0,0300	21,13	2,887	11,548	54,65
0,07595	53,50	5,576	22,304	41,69

Wir ersehen aus der Tabelle, daß die Aufspaltung des Amygdalins durch S. Ludwigii eine weitgehende ist. Weshalb bei einer höheren Konzentration des Glucosides die Hydratisierung und Vergärung gegenüber einer nur 3%igen Lösung zurückblieb, ist zwanglos dadurch zu erklären, daß die anderen Nebenprodukte, wie Blausäure und Benzaldehyd, hemmend auf den Gärprozeß einwirken.

3. Großgärversuche.

Während bei den vorstehend erwähnten Versuchen die Hefe in der Amygdalinlösung selbst wachsen mußte, züchtete ich noch eine etwas größere Menge der S.-Ludwigii-Hefe in einer mit 2% Traubenzucker versetzten sterilisierten Brauereibetriebswürze. Nach der unter den üblichen Kautelen vorgenommenen Waschung der Hefe wurde diese mit 100 ccm einer 3%igen Amygdalinlösung übergossen und im Thermostaten bei 31° 17 Tage aufbewahrt. Genaue quantitative Verhältnisse konnten hier nicht innegehalten werden, da besondere Rücksicht auf die Vermeidung einer Fremdinfektion genommen werden mußte, welche Gefahr bei den Kleingärmethoden nach Paul Lindner und nach Kluijver nicht vorliegt oder doch verschwindend gering ist.

Nach der Aufbewahrung im Wärmschrank während der Dauer von 17 Tagen ließ sich ein deutlicher Geruch nach Benzaldehyd wahrnehmen. In dem Destillat der vergorenen Lösung wurde Blausäure nicht nur qualitativ nachgewiesen, sondern man bestimmte auch die Menge dieser Säure, die für 60 ccm Destillat (80 ccm wurden abdestilliert) 0,0027 g Blausäure betrug. Hieraus berechnet sich eine Aufspaltung des Amygdalins in Blausäure, Benzaldehyd und d-Glucose zu etwa 2,2%.

Die verhältnismäßig geringe Zerlegung des Amygdalins in Blausäure und in die übrigen Komponenten ist ein Beweis

dafür, daß in dem S. Ludwigii neben dem Emulsin[1]) noch ein anderes Enzym, die Amygdalase, vorhanden sein muß, denn nach der Methode Kluijver wurde das Glucosid bis zu 54,65 % gespalten.

Wir ziehen aus diesen Versuchen folgende

4. Schlußfolgerungen.

Der Saccharomycodes Ludwigii Hansen enthält das Enzym Amygdalase sowie Hefenemulsin. Da dieser Pilz Maltose nicht zu vergären vermag, also Maltase nicht enthält, trotzdem aber das Amygdalin weitgehend spaltet, so ist der Schluß gerechtfertigt, daß im Amygdalin keine Maltosegruppe steckt, sondern ein anderer Zucker von der Formel $C_{12}H_{22}O_{11}$, der aus zwei d-Glucose-Bestandteilen zusammengesetzt ist.

Die Vermutung der englischen Forscher, daß im Amygdalin ein anderer Zucker als Maltose gebunden ist, wird durch die vorliegenden Untersuchungen in exakter Weise bestätigt.

[1]) Nachdem die vorstehende Abhandlung bereits gesetzt war, erhielt ich Kenntnis von der Arbeit Carl Neubergs und Eduard Färbers (diese Zeitschr. 78, 264, 1916), nach der bei der Aufspaltung des Amygdalins drei isolierbare Enzyme wirksam sind: die Amygdalase, die Prunase und die Oxynitrilase. Die beiden letzteren hatte ich unter dem Namen Hefenemulsin zusammengefaßt, wenn mir auch bekannt war, daß in dem „Emulsin der Mandeln" mehrere Enzyme vorhanden sind. Bau.

Experimentelle Untersuchungen über das Wesen der Bergkrankheit.

Von

Erwin Rippstein.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 13. Dezember 1916.)

Mit 4 Figuren im Text.

Untersuchungen über das Wesen der Bergkrankheit liegen schon seit fast so lange vor, wie man Beobachtungen über diese merkwürdige, Menschen und Tier in großen Höhen befallende Krankheit gemacht hat. Diese Untersuchungen haben durchaus nicht zu einer einwandfreien, allseitig anerkannten Erklärung geführt, welche Faktoren eigentlich an den krankhaften Symptomen schuld sind. Von der Tatsache ausgehend, daß man es mit Wirkungen zu tun hat, die in der Höhe auftreten, hat man systematisch fast jeden einzelnen Faktor, der gegenüber der Ebene in der Höhe auftritt, als wesentlich in den Vordergrund geschoben. Deshalb sehen wir als Ursachen der Bergkrankheit entweder den Sauerstoffmangel oder den verminderten Luftdruck, unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der Luft, oder die Kohlensäureverarmung der Höhenluft, oder die Ionisierungsverhältnisse der Luft, oder die Lichtstrahlungsverhältnisse, sowie manches andere bezeichnet.

Da es ausgezeichnete zusammenfassende Betrachtungen über die Bergkrankheit gibt, so: Zuntz, Loewy, Müller und Caspari, Höhenklima und Bergwanderungen in ihrer Wirkung auf den Menschen, Berlin und Stuttgart, Bong & Co. 1906; H. Kronecker, Die Bergkrankheit, Urban & Schwarzenberg 1903; O. Cohnheim, Physiologie des Alpinismus, Ergebn. d. Physiol. Bd. 2 u. 12, und E. Stäubli, Das Höhenklima als therapeutischer Faktor, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. XI, Berlin, J. Springer, 1913, sei auf diese Arbeiten verwiesen, in denen sich die gesamte Literatur unseres Gegenstandes befindet.

Bei weitem das Hauptinteresse beanspruchen die beiden großen Theorien, die man als die chemische und die mechanische bezeichnet. Die chemische Theorie führt alle Symptome der Bergkrankheit auf den Sauerstoffmangel zurück. Die wichtigsten Vertreter dieser Theorie sind Paul Bert, Zuntz und seine Mitarbeiter, Durig und seine Mitarbeiter und schließlich Haldane und seine Mitarbeiter. Die Hauptvertreter der mechanischen Theorie, die auf Albrecht von Haller zurückgeht, sind Kronecker und seine Schüler und P. Heger. Nach der mechanischen Theorie ist der verminderte Luftdruck, der Störungen des Lungenkreislaufes hervorruft, und nicht der Mangel an Sauerstoff in der Atmungsluft die wesentliche Ursache der Bergkrankheit. Eine Reihe von sinnreichen Versuchen und Betrachtungen ist angestellt worden, um im Sinne der einen oder anderen Theorie eine Entscheidung herbeizuführen. Prinzipiell scheint es mir bei der kritischen Stellungnahme gegenüber allen diesen Versuchen zunächst wichtig zu sein, darüber Klarheit zu schaffen, was man eigentlich untersucht. Als Bergkrankheit im eigentlichen Sinne des Wortes kann nur dasjenige verstanden werden, was man an Symptomen auf hohen Bergen selbst beobachtet, und streng genommen nur das, was man an Menschen beobachtet. Was an Tieren zu sehen ist, hat wohl unzweifelhaft eine enge Verwandtschaft mit der Bergkrankheit, aber ob die Erscheinungen am Tiere als Bergkrankheit bezeichnet werden können, steht noch dahin. In Laboratoriumsversuchen am Tier sollte man sich aber darauf beschränken, genau zu präzisieren, welche speziellen Symptome man als Kriterien für die Wirkungen der einzelnen Eingriffe wählt, und den Versuch machen, die Beziehungen zwischen den einzelnen Variablen und den begleitenden Symptomen festzustellen. Es scheint mir, daß gerade durch diese Beschränkung man in die Lage versetzt wird, dem Wesen der Bergkrankheit näherzukommen.

Laboratoriumsversuche am Tier werden zumeist in einer Kammer angestellt, in der man den Luftdruck herabsetzen kann. Bei Verminderung des Luftdruckes beobachtet man, sowie der Grad der Luftverdünnung eine gewisse Höhe erreicht hat, schwere Symptome: Änderung der Atmung, Unruhe und Aufregung der Tiere. Dyspnoe und schließlich Daniederliegen

der Tiere mit schwerster Atemnot, die, wenn man die Luftverdünnung nicht behebt, in den Tod übergehen kann. Mit derartigen Versuchen sollte es nun anscheinend nicht schwer sein, entscheiden zu können, ob die Ursache der Störungen in dem verminderten Sauerstoffgehalt der Kammerluft oder in den mechanischen Einflüssen der Luftverdünnung gelegen sei. Das ist aber nicht der Fall. Außerordentlich bemerkenswerte Beobachtungen wurden von Rosendahl[1]) unter Leitung von Kronecker mitgeteilt. Derselbe brachte Ratten in eine Kammer, in der er den Luftdruck mehr und mehr herabsetzte. Als an den Ratten die schwereren Symptome ausbrachen, stellte er den früheren Luftdruck durch Stickstoff wieder her. Hierbei beobachtete er, daß die Tiere sich wieder erholten und allem Anscheine nach normal wurden. Aus seinen Versuchsergebnissen zog er folgerichtig den Schluß, daß, wenn die Luft in der Kammer verdünnt wird, es nicht Sauerstoffverminderung ist, welche die krankhaften Erscheinungen hervorruft, sondern der mechanische Einfluß der Luftverdünnung, da Behebung dieser und nicht Sauerstoffzufuhr die Tiere wieder zur Norm zurückbrachte. Man hätte glauben können, daß diese auffallenden Ergebnisse die Frage nach der Ursache der krankhaften Erscheinungen in der Kammer entschieden hätten. Aber Zuntz[2]) unterzog die Versuche von Rosendahl einer zwar nicht experimentellen, aber rechnerischen Kritik, wobei er zu folgenden Ergebnissen kam:

„Wenn wir Rosendahls Versuche von diesem Gesichtspunkte (daß Rosendahl die Wasserdampf- und Kohlensäuretension in den Alveolen nicht in Rechnung gezogen hat) aus umrechnen, so ergibt sich, daß sie in voller Harmonie stehen mit der Anschauung, daß allein der Sauerstoffmangel die Erscheinungen der Luftverdünnung bewirkt."

Diese Beobachtungen sind so recht geeignet, den Zweifeln entgegenzutreten, die man bisher gegenüber der Erklärung auch der Wirkung geringer Höhen aus Sauerstoffmangel hegte.

Bei diesem Stand der Dinge schien es geraten, diese ge-

---

[1]) Rosendahl, Verminderter Luftdruck tötet nicht durch Sauerstoffmangel. Zeitschr. f. Biol. 52, 16, 1909.

[2]) N. Zuntz, Beobachtungen zur Wirkung des Höhenklimas (Berliner Physiol. Ges.). Med. Klinik 1909, Nr. 11.

radezu elementare Frage wiederum experimentell in Angriff zu nehmen, und ich folgte daher der Anregung von Prof. Asher, um unter seiner Leitung nach neuen Gesichtspunkten zu untersuchen, welcher Faktor der maßgebende ist, wenn bei Luftverdünnung in der Kammer an Ratten schwere Symptome ausbrechen, die man mit der Bergkrankheit in Beziehung zu setzen gewohnt ist.

Es handelte sich darum, in passender Weise gemeinsam und unabhängig voneinander den mechanischen und den chemischen Faktor zu variieren. In dieser Absicht habe ich folgende Versuchsreihen angestellt:

1. Versuche mit Druckverminderung in gewöhnlicher Luft.
2. Versuche mit Druckverminderung, wenn in der Kammer von vornherein eine sehr sauerstoffreiche Luft vorhanden ist.
3. Versuche mit Druckverminderung und Wiederherstellung eines höheren Barometerdruckes in der Kammer mit Hilfe von Stickstoff.
4. Änderung der Aufnahmefähigkeit der Tiere für Sauerstoff und Feststellung der Beziehungen zwischen Sauerstoffversorgung, mit und ohne Druckveränderung, und Befinden der Tiere. Als Mittel, um das Aufnahmevermögen für Sauerstoff zu ändern, wählte ich CO.

In der ersten Versuchsreihe wirken gemeinsam auf die Tiere sowohl die Druckverminderung als solche wie auch die Sauerstoffarmut der verdünnten Luft auf die Tiere ein. Durch Feststellung des Barometerstandes, bei dem die als Kriterien gewählten Symptome eintreten, ist der mechanische Faktor bei der betreffenden Versuchsanordnung gegeben, während die Analyse des Sauerstoffgehaltes der Kammerluft in der gleichen Versuchsphase den chemischen Faktor kundtut. Als einen wesentlichen Teil meiner Aufgabe wurde die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes der Kammerluft in jeder der vier Versuchsreihen erachtet. Es ist klar, daß die Resultate bei der Bestimmung dieser ersten Versuchsreihe nur zur Orientierung dienen können, jedoch an und für sich keinerlei Aufschluß darüber geben, welcher Faktor der wesentliche ist.

Die zweite Versuchsreihe geht in direkterer Weise auf das Ziel los. In dieser ist auf Grund der Versuchsbedingungen die Sauerstoffversorgung eine weit bessere als in der ersten

Versuchsreihe. Wenn daher der chemische Faktor der maßgebende sein sollte, so müßten die Störungen im Befinden der Tiere bei einem niedrigeren Barometerdruck als in der ersten Versuchsreihe eintreten, weil ja bei dem gleichen Barometerdrucke die Kammerluft sauerstoffreicher ist. Wenn aber der mechanische Faktor der maßgebende wäre, so müßten, ganz unabhängig von dem Sauerstoffgehalt der Luft, die krankhaften Störungen bei dem gleichen Barometerdruck wie vorher eintreten. Der einzige Vorbehalt, der gegenüber dieser Betrachtungsweise zu machen wäre, ist der, daß möglicherweise ein Ineinandergreifen der beiden Faktoren stattfindet, so daß die Ergebnisse sich nicht streng schematisch voraussagen ließen.

Die dritte Versuchsanordnung, die auch Rosendahl unter Kroneckers Leitung angewandt hat und die ihn vor allem zu seinen Schlußfolgerungen führte, bringt die mechanischen Verhältnisse mehr oder weniger zur Norm zurück und beläßt die chemischen Verhältnisse in einer tief abgeänderten Weise. Wäre der mechanische Faktor der maßgebende, so müßte unabhängig von der chemischen Zusammensetzung der Kammerluft eine Wiederherstellung der Tiere erfolgen, wenn der Barometerdruck einen Wert erreicht hat, der nicht weit über dem kritischen Wert liegen müßte. Wenn aber der chemische Faktor maßgebend wäre, so müßten die krankhaften Symptome bei einem Barometerstand eintreten, der gerade die Höhe erreicht hat, die ziemlich ansehnlich sein muß, daß ein genügender Sauerstoffdruck zur Verfügung steht.

Allen drei Versuchsreihen ist methodisch außer der Bestimmung des Barometerstandes, bei dem die kritischen Symptome eintreten, die Ermittelung des Sauerstoffgehaltes der Kammerluft gemeinsam. Jeder Versuch schloß damit ab, daß ich den Sauerstoffgehalt der Kammerluft mit Hilfe der Buntebürette analysierte. Die Buntebürette, deren Handhabung in den Lehrbüchern der analytischen Chemie von Friedheim und von Treadwell auseinandergesetzt ist, gibt Resultate, die bei sorgfältiger Ausführung bis auf $0{,}1\,\%$ genau sind. Mit diesem Genauigkeitsgrad für die Sauerstoffbestimmungen in meinen Versuchen glaubte ich mich begnügen zu dürfen. Aus dem Sauerstoffgehalte wurde unter Berücksichtigung des Barometerstandes, der Temperatur und der Wasserdampfspannung in den Alveolen

der jeweilig herrschende Sauerstoffdruck und die Sauerstoffspannung in den Alveolen berechnet.

Die etwas komplizierten Verhältnisse der vierten Versuchsanordnung werde ich bei der Beschreibung meiner diesbezüglichen Versuche näher erörtern. Ich gehe jetzt dazu über, meine Versuchsanordnung, soweit sie in allen Versuchen die gleiche war, zu beschreiben.

Die beigegebene Zeichnung zeigt meine Versuchsanordnung.

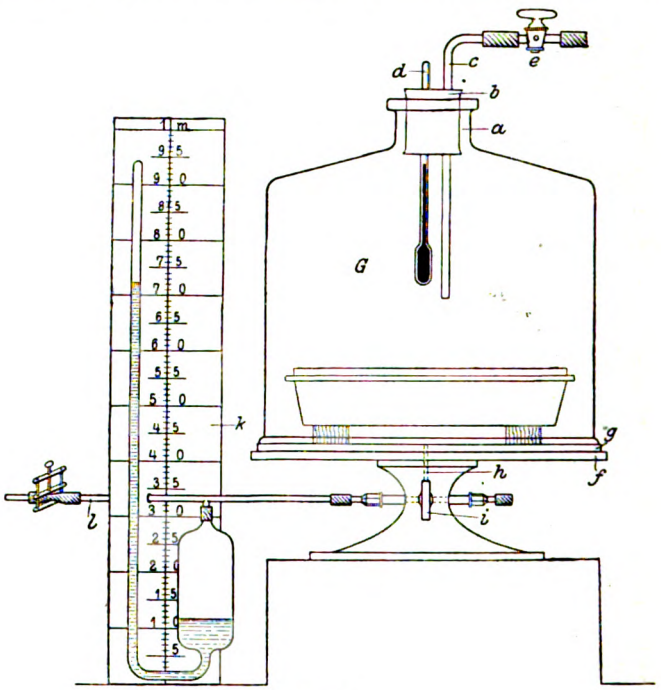


Fig. 1.

Der Hauptbestandteil des Apparates ist eine unten geschliffene Glasglocke *G* mit einer Öffnung *a* oben, in der ein Gummistöpsel *b* steckt. Dieser ist doppelt durchbohrt, um die Glasröhre *c* zur Luftentnahme und einen Thermometer *d* aufzunehmen. Die Röhre *c* ist direkt mit der Quecksilberpumpe verbunden und bis zum Hahn *e* mit Quecksilber gefüllt. Der Boden *f* der Kammer ist mit einer Glasplatte *g* bedeckt, um einen vollständigen Luftabschluß mit dem unten geschliffenen Rande der Glasglocke zu erhalten. Auf der Mitte des Bodens

geht eine Verbindung *h* nach dem Dreiweghahn *i*, der die Kammer einerseits mit der Wasserstrahlpumpe, andererseits mit dem Barometer *k* verbindet. Die Öffnung *l* nach außen ist sowohl geschlossen durch einen Quetschhahn als auch durch einen kurzen Glasstab. Von hier wurde die Luft zugelassen nach der Evakuierung und Entnahme einer Probe der Kammerluft durch die Quecksilberpumpe.

Ebenso wurden durch diese Öffnung in den Sauerstoff- und Stickstoffversuchen aus den betreffenden Bomben die Gase in die Kammer eingeführt. Der Druck wurde jeweils innerhalb 2 bis 7 Minuten auf normalen Barometerstand erhöht Die Druckablesung am Barometer war eine Differentialablesung indem sowohl der Stand des aufsteigenden wie des absteigenden Quecksilbers abgelesen wurde. Die Wasserstrahlpumpe ermöglichte mir ein Evakuieren der Kammer bis auf 7 mm herunter, welcher Zustand nie erreicht werden mußte. Die Zeitdauer war beliebig durch die Intensität des ausfließenden Wassers zu regulieren.

Um die von meinen Versuchstieren abgegebene Kohlensäure auf ein praktisches Minimum zu reduzieren, brachte ich von Versuch 17 an eine mit einem Drahtgitter gedeckte Schale mit konzentrierter Kalilauge in die Kammer. Damit stieg in der Folge der Kohlensäuregehalt nie über $2^1/_2\,\%$. Um die Fehlerquelle einer eventuell mangelhaften Diffusion von Kohlensäure im Raume auszuschalten, führte ich die Röhre *c* zur Entnahme der Kammerluft für die Analyse bis zur Stelle herab, wo die Tiere sich befanden. Damit erhielt ich die Luft genau in dem Gemenge, wie sie die Tiere einatmeten. Das Absaugen geschah durch eine Quecksilberpumpe. Der Inhalt derselben war 1 l, um mir bei großer Verdünnung der Kammerluft zu ermöglichen, die zur Analyse notwendigen 100 ccm Gas bei 720 mm zu erhalten.

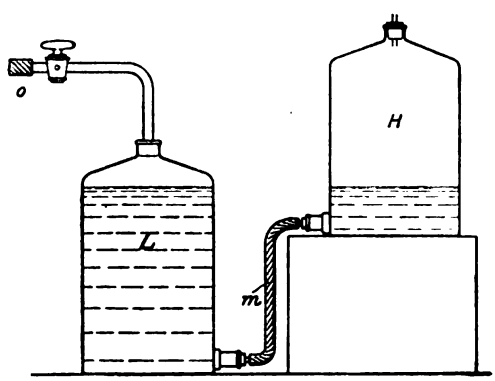


Fig. 2.

Der Hahn *e* schließt die Pumpe bei den Versuchen gegen die Kammer ab. Durch Senkung des Gefäßes *H* wird die Luft durch den Schlauch *o* in die Flasche *L* abgesaugt, indem das Quecksilber durch den Schlauch *m* nach *H* abfließt. Zur Analyse des Gases wird es durch Hochstellen von *H* wieder aus *L* in die Buntebürette ausgetrieben.

Die Ausführung der Versuche ist folgende:

Ich bringe 3 bis 4 Ratten unter die Glasglocke, schließe die Einlaßöffnung *L* mit Quetschhahn und Glasstöpsel ab, verbinde die Quecksilberpumpe, die bis zum Hahn *e* gefüllt ist, mit der Röhre *c*. Den Dreiweghahn stelle ich in Verbindung mit *h* und der Wasserstrahlpumpe. Jetzt beginne ich zu evakuieren. Gewöhnlich dauert es 10 bis 20 Minuten bis zum Auftreten des kritischen Punktes. Das Verhalten der Tiere in der Kammer war bei allen Tieren das nämliche: Beim Beginn kratzen sich die Tiere, besonders an den nackten Stellen des Körpers, Nase und Füße; dann werden sie allmählich ruhiger und liegen zueinander. Plötzlich springen sie auf, schnappen nach Luft, indem sie sich auf die Hinterbeine stellen, und fallen um. Sie bleiben auf der Seite oder auf dem Bauche liegen und strecken die Extremitäten von sich. Sofern sie überhaupt noch Bewegungen machen, sind dieselben schleppend. Die Atmung ist sehr frequent und dyspnoisch. Sie lassen Urin und Kot unter sich gehen. Das Eintreten von diesem Symptomenkomplex nehme ich als Kriterium an. Er tritt so bestimmt und plötzlich auf, daß er nichts Zweifelhaftes an sich hat. Die Resultate zeigen sehr deutlich seine Genauigkeit. Die Laboratoriumsversuche bieten mannigfache Vorteile gegenüber Versuchen in der Höhe. Es ist uns hier möglich, die Einwirkung eines einzelnen Faktors zu untersuchen. Andere Faktoren, wie Temperatur und Witterung, haben keinen Einfluß. Ferner erlaubt uns die Laboratoriumseinrichtung eine einfachere und genauere Arbeit in bezug auf Analyse und Änderung der Luftzusammensetzung. Der Einfluß der Muskelarbeit fällt ebenfalls außer Betracht. In bezug auf die Zeit können wir die nämlichen Verhältnisse wie bei den Aeronautikern herstellen.

Als Nachteil können wir den Umstand erwähnen, daß wir über das subjektive Empfinden der Tiere nichts erfahren

können, ein Moment, welches überhaupt bei allen Tierversuchen auftritt. Hingegen ist es uns durch die objektive Beobachtung möglich, Rückschlüsse auf dasselbe zu ziehen. So können wir das Verhalten der Tiere im Excitationsstadium wohl nur auf Erstickungsgefühle zurückführen, und die Art des Hinfallens gestattet einen Rückschluß auf Schwindel.

Die Temperatur der Ratte beträgt anal gemessen 38,4°. Demnach beträgt die Wasserdampfspannung in den Alveolen der Ratte 50,0 mm. Dieser Wert wurde bei der Berechnung der alveolären Sauerstoffspannung zugrunde gelegt. Wenn wir den am Barometer h abgelesenen absoluten Druck mit p bezeichnen, den Prozentgehalt von Sauerstoff in der Kammerluft mit o, so erhalten wir den Partialdruck des Sauerstoffs in den Alveolen der Ratten durch folgende Formel:

$$\frac{(p-50{,}0)\,o}{100}$$

oder im allgemeinen bei allen Tieren, wenn wir die Wasserdampfspannung in den Alveolen mit a bezeichnen:

$$\frac{(p-a)\,o}{100}.$$

Tabelle I.

Nr.	Tages-barometer	Abs. Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Red. Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Sauerstoff in %
1	711	194	144	20,6
2	711	174	124	20,6
3	711	190	140	21,7
4	710	224	174	20,4
5	710	228	178	20,8
6	713	202	152	21,2
7	713	233	183	20,8
8	720	205	155	21,4
9	710	200	150	21,0
10	710	239	189	21,0
11	716	204	154	20,8
12	727	231	181	21,0
13	727	225	175	21,0
Versuch 1—13		2729	2099	272,3
Durchschnitt		209,92	161,46	20,95
Abzüglich 3,5% Kohlensäure				17,45

Die Versuche mit gewöhnlicher Luft lassen sich nach den dabei angewandten Methoden in zwei Reihen einteilen. In der 1. Reihe analysierte ich die Kammerluft ohne vorherige Absorption und Bestimmung des Kohlensäuregehalts. In der 2. Reihe bestimmte ich immer zuerst den Kohlensäuregehalt. Im Verlaufe jener 2. Versuche schaltete ich dann noch die oben erwähnte Verbesserung ein, indem ich in die Kammer ein Gefäß mit konzentrierter Kalilauge brachte, die die Kammerluft während des Experimentes zum Teil von der Kohlensäure befreite. Ich evakuiere die Kammer bis zum Auftreten des kritischen Punktes, lese den Barometerstand ab und entnehme Luft zur Analyse. Tabelle I zeigt die Resultate dieser 1. Klasse der Versuchsreihe mit gewöhnlicher Luft.

Sauerstoffpartialdruck:

28,17 mm.

Der Durchschnitt von Kohlensäure hat sich aus einigen der nächstfolgenden Versuche als 3,5 ergeben. Der Durchschnitt des reduzierten Druckes beträgt 161,46 mm, derjenige des Sauerstoffgehaltes 20,95 %. Ziehen wir davon nun die 3,5 % Kohlensäure ab, so erhalten wir an Sauerstoff einen Durchschnittswert von 17,45 %. Nach der oben angeführten Formel beträgt somit der alveolare Sauerstoffdruck 28,19 mm.

Tabelle II.

Nr.	Tages-barometer	Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Red. Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Kohlensäure in %	Sauerstoff in %	Sauerstoffpartialdruck
14	711	204	154	2,4	18,6	28,64
15	711	180	130	3,2	18,8	23,14
16	719	216	166	4,0	16,8	27,89
17	724	196	146	1,6	18,8	27,45
18	725	177	127	2,2	20,0	25,40
21	722	196	146	2,6	18,8	27,45
23	721	207	157	2,2	17,5	27,48
		1376	1026			
Total des Sauerstoffpartialdruckes						187,45
Mittelwert . . .		196,57	146,57			

In der 2. Klasse der 1. Reihe ist die Kohlensäure der Kammerluft mit bestimmt worden. Versuch 17, 19, 21, 23

sind zugleich Kontrollversuche der 2. Versuchsreihe, zu den Versuchen mit sauerstoffreicher Luft. Tabelle II zeigt die Resultate dieser 2. Reihe.

Durchschnitt des Sauerstoffpartialdruckes pro Versuch:

26,78 mm.

Bei Versuch 14, 15 und 16 war noch kein KOH in der Kammer.

In der dritten Tabelle sehen wir die Ergebnisse der beiden Klassen zusammengestellt, um ein Mittel aus den Versuchen mit gewöhnlicher Luft zu haben.

Tabelle III.

Zusammenstellung:

1. Kategorie	13 Versuche	26,17 mm =	366,21 mm
2. „	7 „	26,78 mm =	187,46 mm
Total	20 Versuche		553,67 mm

Durchschnittlicher Wert der alveolären Sauerstoffspannung in den Versuchen mit gewöhnlicher Luft:

27,68 mm.

Diese erste Versuchsreihe zeigt eine große Übereinstimmung der Resultate. Sie zeigt, daß die Symptome bei vermindertem Luftdruck im Durchschnitt bei einem relativen Sauerstoffdruck von 27,68 mm auftreten. Es entspricht dieses Resultat einem Außendruck von 182,1 mm bei ganz reiner Luft von 20,96% Sauerstoff. Dieser Barometerstand entspricht einer Höhe von ca. 10000 m über Meer (schätzungsweise nach Paul Bert: La pression barométrique), d. h. Ratten zeigen die oben beschriebene, mit der der Bergkrankheit ähnliche Symptomatologie in normaler Luft und ohne Arbeitsleistung von seiten der Tiere bei einer ungefähren Höhe von 10 km über Meer.

Vergleichen wir die Einzelresultate in ihrer Beziehung zum Durchschnittsresultat, so finden wir mit Ausnahme der Versuche 14, 15, 19 sehr übereinstimmende Werte. Der Durchschnitt der ersten 13 Versuche zeigt auch keine große Abweichung von diesem Gesamtresultat. Die übrigen 4 Versuche liegen innerhalb sehr geringer Grenzen, zwischen den Werten

27,45 (17 und 21) und 27,89 (16), d. h. die Differenz dieser Sauerstoffspannungen ist nur 0,44 mm, die durch die Methodik und die subjektive Beobachtung genügend erklärt wird. Die hohen Werte der Versuche 12 und 14 lassen sich daraus erklären, daß ich von Versuch 12 an neue Tiere hatte, da die andern während einer Versuchsunterbrechung von 2 Wochen im Stalle ad exitum gekommen waren. Die hohen Druckwerte in Versuch 12 und 13 und der hohe Partialdruck des Sauerstoffs in Versuch 14 lassen sich aus dieser Änderung der Versuchstiere erklären. Zwischen 14 und 15 liegen einige Stunden Zeit. Wahrscheinlich sehen wir in letzterem Versuch die von den meisten Autoren angeführte „Anpassungs"-Reaktion. Der Hauptunterschied der Versuchsreihe liegt nicht in prozentualer Zusammensetzung der Kammerluft, sondern im absoluten Druck. Auch die reine mechanische Theorie müßte diese Abweichung in Betracht ziehen und könnte die oben angeführten Differenzen nur durch diese gemachte Annahme erklären. In Versuch 19 sind wahrscheinlich abnorme Versuchsfehler die Ursache der Verschiedenheit.

Obwohl die Experimente mit gewöhnlicher Luft schon sehr übereinstimmende Resultate ergeben, sind sie doch noch nicht beweisend für eine definitive Schlußfolgerung. In den zwei folgenden Versuchsreihen wurde deshalb die geplante, früher beschriebene Änderung der Luftzusammensetzung vorgenommen. Die zweite Reihe sind Versuche mit vermehrtem, die dritte mit vermindertem Sauerstoffgehalt.

Tabelle IV.

Nr.	Tages-barometer	Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Red. Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Kohlensäure in %	Sauerstoff in %	O_2-Druck
18	724	85	35	4,2	64,6	22,61
20	725	89	39	2,6	59,1	23,05
22	722	100	50	1,2	49,1	24,55
24	721	91	41	6,9	57,8	23,70
		365	165			
Sauerstoffpartialdruck im Total						93,91
Mittelwert . . .		91,25	41,25			

Die Methodik zur Vermehrung des Sauerstoffes in der Kammer war folgende: An *l* habe ich eine Sauerstoffbombe

angesetzt, alles übrige ist gleich, wie in der ersten Versuchsreihe. Ich evakuierte nun bis auf 400 mm und ließ zur Erhöhung des Luftdruckes Sauerstoff nachfließen. Diese Prozedur wiederholte ich einige Male. Als ich glaubte, den Sauerstoff in der Kammer genügend angereichert zu haben, begann ich die eigentliche Evakuation. Tabelle IV zeigt die Werte dieser Versuchsreihe.

Durchschnitt des Sauerstoffpartialdruckes pro Versuch:

23,48 mm.

Der mittlere Sauerstoffpartialdruck dieser Versuchsreihe beträgt also 23,48 mm. Die einzelnen Resultate weichen voneinander im Maximum 1,94 mm ab. Die beiden extremsten Werte gehören zu den am meisten verschiedenen absoluten Drucken von 85 und 100 (Versuch 18 und 22); dazwischen reihen sich die beiden andern Versuche in der Reihenfolge ihres aufsteigenden absoluten Druckes ein. Der höchste Partialdruck dieser Reihe (24,55 mm) mit dem höchsten absoluten Druck nähert sich schon stark dem Mittelwert der vorhergehenden Versuchsreihe, d. h. dem Werte von 27,70 mm. Sehr interessant ist überhaupt der beinahe um $^1/_6$ niedrigere durchschnittliche Partialdruck im Vergleich zu dem der ersten Reihe. Die folgenden Versuche werden uns die Sache noch besser beleuchten.

Die dritte Versuchsreihe wurde dem Versuchsplan zufolge in sauerstoffarmer Luft durchgeführt. Die Technik war die gleiche wie bei der zweiten Reihe, natürlich mit dem Unterschiede, daß ich an Stelle des Sauerstoffes Stickstoff in die Kammer nachströmen ließ; einzig in Versuch 28 hatte ich dazu noch eine weitere Änderung angebracht, indem ich die Sauerstoffverarmung durch Absorption desselben in einem System von Pyrogallol-Waschflaschen weitertrieb. Hier das Schema des Absorptionsapparates:

An *l* des Apparates ist ein Dreiwegrohr angeschlossen. *p* geht zur Stickstoffbombe, *q* zum Absorptionssystem. Dieses besteht aus 4 Waschflaschen mit Pyrogallol, je 2 und 2 hintereinandergeschaltet. Zwischen beiden Systemen ist die Quecksilberpumpe eingefügt, welche durch Klemmschrauben von den Waschflaschen abgeschlossen werden konnte. Mittels des Drei-

wegrohres r steht sie in Verbindung mit dem Apparate. Schlauch t führt die Luft in die Kammer zurück und zwar so, daß an Stelle des Thermometers d eine gebogene Glasröhre eingeschaltet worden war. Dieses Absorptionssystem ist durch Klemmschrauben s_2 und s_5 gegen die Kammer hin abgeschlossen. Klemmschraube s_1 erlaubt uns, die Kammer auch gegen die Stickstoffbombe hin abzuschließen.

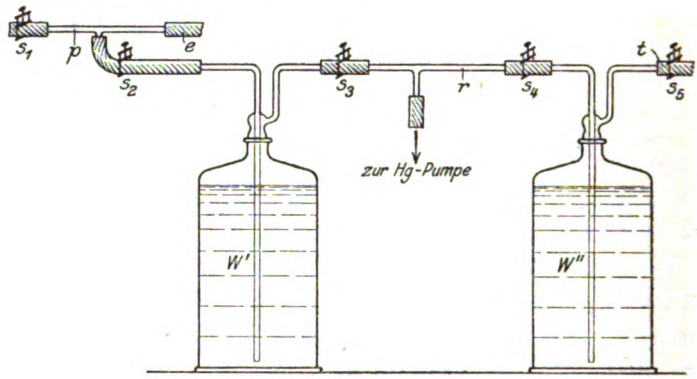


Fig. 3.

Nachdem ich die Kammer auf gleiche Weise wie bei den vorhergehenden Versuchen mit Stickstoff angereichert habe, schließe ich Hahn s_1, s_4 und s_5 und sauge Luft durch die Flaschen W^0 in die Quecksilberpumpe hinein, schließe dann s_2 und s_3 und öffne s_4 und s_5 und presse Luft in die Kammer zurück.

Tabelle V.

Nr.	Tages-barometer	Abs. Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Red. Druck bei Eintreten der kritischen Symptome	Kohlen-säure	Sauer-stoff in %	O_2-Druck
25	723	312	262	0,8	11,0	28,82
26	720	402	352	0,2	8,2	28,86
27	714	309	—	—	—	—
	—	410	—	—	—	—
	—	445	—	—	—	—
	—	507	457	0,8	6,4	29,25
28	710	191	—	—	—	—
	—	387	—	—	—	—
	—	617	567	1,6	5,2	29,48
Total des Partialdruckes		1838	1638			116,41
Mittelwert		459,50	409,50			

Durch diesen steten Kreislauf setzte ich den Sauerstoffgehalt langsam auf ein Minimum herab. Tabelle V zeigt die Resultate.

Diese Prozedur dauerte eine Stunde. Nach Ablauf derselben konnte ich die Sauerstoffmenge als genügend herabgesetzt betrachten und begann wie gewöhnlich zu evakuieren.

Durchschnitt des Sauerstoffpartialdruckes pro Versuch:

29,10 mm.

Die dritte Versuchsreihe ergibt einen Mittelwert von 29,10 mm. Derselbe ist also noch höher als der vorhergehende. Auch innerhalb der Reihe selbst sehen wir einen Anstieg mit steigendem absolutem Druck. Wenn auch die Differenz der äußersten Versuche nur 0,66 mm beträgt, so ist sie doch sehr auffällig und paßt genau in den Rahmen der Unterschiede bei den vorhergehenden Versuchen. Das letzte Experiment dieser Reihe (28) zeigt sehr deutlich, bei welch geringer Druckverminderung schon die Symptome auftreten können, und doch ist der Partialdruck des Sauerstoffs gegenüber den Versuchen mit gewöhnlicher Luft nur um 1,40 mm verschieden, d. h. zwischen den Meereshöhen von 10000 und 1700 m, welch letztere etwa der Lage von St. Moritz entspricht, woselbst an Menschen die Bergkrankheit noch nie aufgetreten ist, geschweige denn an Ratten, welche viel größere Höhen zu ertragen vermögen, wie dies die erste Versuchsreihe zeigt.

In Tabelle V finden wir unter Versuch 27 und 28 verschiedene Druckangaben; es sind diejenigen, bis auf welche ich den Kammerdruck jeweils wieder herabsetzte, bevor ich Stickstoff zuließ.

In diesen Versuchen ist aber ein Moment nicht von vornherein erklärlich, warum durch Zusatz von Stickstoff die Erscheinungen nicht stationär geblieben sind. Anscheinend mit vollem Recht kann man hier die Einwendung machen, daß es unmöglich wäre, noch einmal zu evakuieren, wenn die Symptome einmal aufgetreten waren und ich den Druck mit Stickstoff auf normal gesetzt hatte. Es ist dies die Einwendung, die Rosendahl gegen die chemische Theorie gemacht hat. Auch bei mir haben sich die Symptome tatsächlich durch Druckausgleich mit dem indifferenten Stickstoff gebessert. Das muß auch eintreten

nach unserer Berechnung, wenn wir den Wasserdampf in den Alveolen der Tiere in Betracht ziehen. Nehmen wir ein Beispiel an, das die Sache erleuchten wird: Ich habe abgelesen 180 mm absoluten Druck bei 20 % Sauerstoffgehalt. Das macht in den Rattenlungen einen Sauerstoffdruck von 26,0 mm aus. Bei 720 mm absolutem Druck hätten wir dann durch Ausgleich mit vollkommen reinem Stickstoff einen %-Gehalt von Sauerstoff von $5^1/_3$ %, demnach einen Sauerstoffpartialdruck von $5^1/_3$ % × 650 mm = 35,73 mm Sauerstoffpartialdruck. Schon diese Berechnung zeigt deutlich, daß der Versuch Nr. 7 von Rosendahl für die mechanische Theorie keinen Beweis gegen die Sauerstofftheorie gibt. Außerdem enthält der käufliche Stickstoff noch relativ viel Sauerstoff, nach Rosendahls Untersuchungen 0,6 %, nach meinen Analysen an dem eingelieferten angeblich reinen Stickstoff 2 %. Gerade der folgende Versuch Rosendahls, Nr. 8, gibt sehr deutlich den Beweis für die Unhaltbarkeit der rein mechanischen Theorie, indem dort das Tier auch bei einem Druck von 700 mm in 13 Minuten wieder dyspnoisch wird, welcher Umstand sich nur dadurch erklären läßt, daß das Tier den vorhandenen Sauerstoff verbraucht und so die Partialspannung desselben herabdrückt bis zu einem Minimum, wo die Erscheinungen wieder auftreten.

Stellen wir alle Versuche zusammen und berechnen wir daraus den mittleren Partialdruck des Sauerstoffs, so erhalten wir einen Wert von 27,30 mm, wie dies die nachfolgende Tabelle zeigt.

Tabelle VI.

Zusammenstellung sämtlicher Versuche.

1. Versuchsreihe	(gew. Luft) . .	20 Vers.	zu	27,70 =	554,00
2. „	(O-reiche Luft)	4 „	„	23,48 =	93,92
3. „	(O-arme Luft)	4 „	„	29,10 =	116,40
	Total	28 Vers.	. . . . .		764,32

Durchschnitt des Sauerstoffpartialdruckes sämtlicher Versuche:

27,30 mm.

Wir sehen hier nun alle drei Versuchsreihen in einer gewissen Übereinstimmung des Sauerstoffpartialdrucks. Die Differenz der extremsten Werte (Reihe 2 und 3) beträgt 5,62 mm,

d. h. etwas mehr als $^1/_5$. Stellen wir aber nun die Versuche mit gewöhnlicher Luft und die Stickstoffversuche zusammen, so differieren die Werte nur um 1,40 mm. Wir können von einer experimentellen Gleichheit sprechen; denn obwohl der absolute Druck um 400 mm verschieden ist, ist der Unterschied des Partialdruckes des Sauerstoffes nur der geringe angegebene Wert. Selbst bei In-Rechnungsnahme der 1. Versuchsreihe müssen wir zum Schluß kommen, daß der Grund für die in niederem Luftdruck auftretenden Symptome Folgen des geringen Sauerstoffpartialdruckes sind.

Betrachten wir die einzelnen Versuche aller drei Versuchsreihen mit Ausnahme der weiter oben diskutierten Versuche 14, 15 und 19, so ergibt sich nachfolgende Tabelle 7:

Tabelle VII.

Nr.	Abs. Druck	Sauerstoff in %	Sauerstoff-druck	Differenz
18	85	64,6	22,61	
				0,44
20	89	59,1	23,05	
				0,65
24	91	57,8	23,70	
				0,85
22	100	49,1	24,55	
				2,90
17	106	18,8	27,45	
				0
21	106	18,8	27,45	
				0,03
23	207	17,5	27,48	
				0,41
16	216	16,8	27,89	
				0,93
25	312	11,0	28,82	
				0,04
26	402	8,2	28,86	
				0,39
27	507	6,4	29,25	
				0,13
28	617	5,2	29,48	

Wir sehen hier, daß bei steigendem absolutem Druck auch der Partialdruck des Sauerstoffes steigt. Die Differenz zwischen den einzelnen Werten nimmt von Reihe zu Reihe prozentual ab, auch absolut nimmt das Maximum der Differenz zwischen den einzelnen Gliedern der drei Reihen ab, ferner ist der Unterschied zwischen den aneinanderstoßenden Gliedern der 1. und 2. Reihe mehr als dreifach so groß, wie zwischen der 2. und 3. Reihe. Je geringer der Druck ist, um so stärker verändern Schwankungen desselben in gleichlautendem Sinne den Sauerstoffpartialdruck.

Die Versuche haben unzweideutig gezeigt, daß mit Bestimmtheit der Sauerstoffpartialdruck einzig und allein für das Auftreten der Symptome maßgebend ist, indem trotz eines

Unterschiedes des absoluten Druckes von 1 zu 7 die Schwankung des Partialdruckes nicht einmal ganz drei zu vier ist. Ferner waren die Symptome immer absolut die gleichen. Tabelle 7 zeigt uns aber auch noch eine Änderung des notwendigen Partialdruckes mit der Änderung des absoluten Druckes, aber nicht in entgegengesetztem Sinne, wie es die mechanische Theorie erweisen müßte, sondern in gleichlautender Richtung. Die Verminderung des absoluten Druckes scheint einen Faktor zu enthalten, der in günstigem Sinne auf die Atmung einzuwirken vermag. Folgende Annahme stellt einen Versuch dar, die Erscheinung zu erklären:

Verminderter Luftdruck wirkt auf die Lungengefäße auch mechanisch und zwar in dilatatierendem Sinne, verursacht damit eine bessere Durchblutung der Lunge und als Folge derselben eine Förderung des Gasaustausches. Dieser letztere Schluß stimmt vollkommen mit den Untersuchungen von Anderes und Cloetta überein, die in ihrer Abhandlung: Beweis der Contractilität der Lungengefäße und die Beziehung zwischen Lungendurchblutung und Sauerstoffresorption (Arch. f. Physiol., Jahrg. 1916) als Schlußfolgerung schreiben: .... „dagegen wird durch die bessere Durchblutung der Lunge die Sauerstoffresorption bedeutend gefördert".

Mit dieser Erklärung ist auch die Tatsache, daß in der 1. Reihe die Differenzen größer sind als in der 2. und 3., begründet. Diese drei ersten Versuchsreihen ergeben also:

Verminderter Luftdruck wirkt auf den tierischen Organismus in erster Linie durch den geringen Sauerstoffpartialdruck. Seine mechanische Wirkung auf die Lungengefäße ist eine günstige, indem sie zu einem vermehrten Gasaustausch führt. Diese Wirkung fällt mit steigender Luftverdünnung immer mehr in Betracht.

Um die erste meiner Behauptungen noch näher zu beweisen, daß der Sauerstoffmangel selbst die Symptome hervorruft, ging ich zu Versuchen mit Kohlenoxyd über, womit ich den inneren Faktor der Sauerstoffaufnahme durch das Blut ändern wollte[1]).

[1]) Haldane (Douglas und Haldane, Journ. of Physiol. **44**, 293, 1912, und Douglas, Haldane, Henderson und Schneider, Philos. Transactions of Roy. Soc. of London, B. **208**, 1915) hat auf die Ver-

Die Giftigkeit des Kohlenoxyds beruht bekanntlich auf der viel größeren Affinität desselben gegenüber dem Sauerstoff zum Hämoglobin des Blutes und zum Körpereiweiß und der damit verbundenen geringeren Dissoziierbarkeit der CO-Eiweißverbindungen des tierischen Organismus. Das CO-HB kann nicht mehr Überträger von Sauerstoff zu den Organen des Körpers sein. Der Körper beginnt an Sauerstoffmangel zu leiden. Ist der oben von mir aufgestellte Satz richtig, so muß Kohlenoxydvergiftung die gleichen Symptome hervorrufen wie Druckverminderung.

Diese zweite Hauptversuchsreihe läßt sich wieder nach der Technik in zwei Unterabteilungen teilen, indem ich zuerst den bloßen Einfluß des CO auf das Tier ohne Druckverminderung studierte und dann erst in zweiter Linie die Einflüsse des Giftes mit der Druckverminderung kombinierte.

Die Technik der Versuche ist folgende:

1. Ich bringe ein Tier unter eine Glasglocke, deren Inhalt genau bekannt ist, und bringe sofort auch eine ganz bestimmte Menge von CO hinein. Ich lasse das Tier bis zum Auftreten der typischen Vergiftungserscheinungen in der Kammer.

2. Ich verbinde mit dieser Vergiftung noch den Einfluß des verminderten Luftdruckes und zwar in einem Versuchsabschnitt so, daß ich das Tier zuerst mit CO behandle und das so vorbereitete Tier unter die Vakuumglocke bringe; im andern bringe ich das CO direkt in die Evakuierungskammer.

Nebenstehende Figur zeigt die Anordnung der kleinen CO-Kammer.

Die Glasglocke *S*, die luftdicht auf dem Fuß *F*

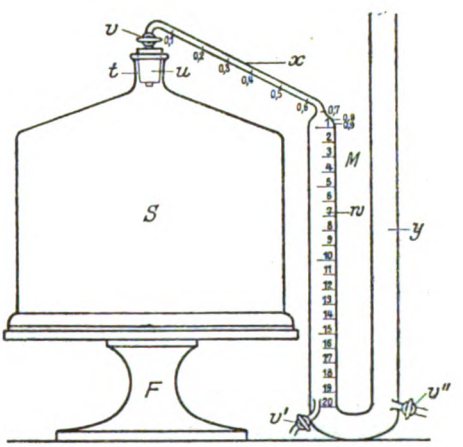


Fig. 4.

wandtschaft zwischen CO-Vergiftung und Bergkrankheit hingewiesen, und seine Ausführungen haben mit den Anstoß zu den nachfolgenden Versuchen gegeben.

ruht, hat oben eine Öffnung t, die einen einfach durchbohrten Stopfen u trägt. Ein Gasometer M führt durch diese Bohrung in die Kammer. Dieser trägt vor seinem Eintritt den Hahn v, der die Kammer gegen den Gasometer abschließt. Der aufsteigende Schenkel w und das Verbindungsstück x sind kalibriert; in w mündet unten der Hahn v' zum Einführen des CO. Der absteigende Schenkel y trägt einen 3. Hahn v'' zum Ausgleich des Wassers beim Füllen des Gasometers und der Kammer.

Zur Ausführung eines Versuches fülle ich den Gasometer M mit Wasser bis zum Hahn v. Jetzt schließe ich v und lasse durch v' eine beliebige Menge CO in den Schenkel w einströmen, indem ich gleichzeitig aus v'' Wasser abfließen lasse bis zur Niveaugleicheit mit w, schließe v' und lese die Menge ab. Jetzt verbinde ich v'' mit einem höher gelegenen Wassergefäß. Das Tier kommt nun in die Kammer. Ich schließe sie unten gut ab, öffne v'' und v. Durch langsames Nachfließenlassen von Wasser durch v'' treibe ich die gewünschte Menge CO in die Kammer und notiere mir die Zeit. v'' und v' werden geschlossen und die Ablesung und die Niveaugleichheit nachkontrolliert.

Das Verhalten der Tiere war nun folgendes:

Das Tier begann sich zu putzen und auch vorzüglich an den nackten Stellen zu kratzen. Es war sehr lebhaft. Darauf folgte ein Stadium träger Bewegungen und der Ruhe, dann ein Aufspringen und Luftsuchen. Eine starre Bewegung, die Ratte fiel um, blieb liegen, sei es auf der Seite oder auf dem Bauche, indem sie ihre Beine von sich streckte. Die Atmung, die vorher schon angestrengt war, wird ganz dyspnoisch. Defäkation und Urinieren traten gleichzeitig auf.

Jetzt lese ich die Zeit ab und notiere sie mir, und das Tier wird freigelassen.

Vergleichen wir nun diese Symptome mit denjenigen bei bloßer Druckverminderung, so sehen wir die auffallendste Übereinstimmung. Selbst Symptome, die man vielleicht auf mechanische Gründe zurückzuführen geneigt wäre, wie das Kratzen, treten bei dieser rein chemischen Einwirkung auf, und zwar in genau der gleichen Weise wie in den frühern Versuchsreihen.

Der Inhalt der Kammer beträgt 4250 ccm, rechnen wir die Raumverdrängung des Tieres auf 150 ccm, so erhalten wir

einen effektiven Rauminhalt von 4100 ccm. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Zeiten, die notwendig sind, um die Tiere in das letzte Stadium des oben beschriebenen Symptomenkomplexes zu bringen. Als Kriterium wurde der gleiche Zustand angenommen wie in den vorherigen Versuchsreihen.

Tabelle VIII.

Nr.	Menge CO ccm	CO in %	Zeitdauer bis zum Auftreten der S
29	17,0	0,4146	7′ 30″
30	11,0	0,2683	10′ 0″
31	10,2	0,2488	14′ 0″
32	7,9	0,1927	34′ 0″
33	6,0	0,1463	Nach 58′ noch keine Symptome
	3,8	nachgelassen	in 3′ waren sie da
	9,8	0,2390	

Die Tabelle zeigt die progressive Abnahme der Zeitdauer bei Vermehrung des CO-Gehaltes in der Kammer. Abderhalden gibt an, daß 0,1% CO und weniger keine Summation im Blute bewirkt. Kommen wir über diesen Prozentgehalt, so zeigt die Tabelle einen rapiden Zeitabfall. Schon Versuch 32 zeigt bei noch nicht einmal dem Doppelten des Abderhaldenschen Maximums das Auftreten der kritischen Symptome in 34′, Versuch 29 mit etwas mehr CO als dem Doppelten von 34 weist nur den $4^1/_2$ten Teil der Zeit auf wie Versuch 32. Sehr interessant ist Versuch 33, bei dem der Prozentgehalt noch mehr als ein Drittel desjenigen von Versuch 29 ist. Trotz dieses geringen Unterschiedes haben wir in der 8fachen Zeitdauer noch keine Symptome. Daß aber hier auch schon in dieser Zeit eine Summation eingetreten ist, zeigt der Umstand, daß nach Zulassen von 3,8 ccm, d. h. bis zu einem Prozentgehalt, der denjenigen von Versuch 31 noch nicht übersteigt, wir die Symptome schon 3 Minuten später erhalten, im Gegensatz zu 31.

Nachdem ich nun die physiologischen Wirkungen des CO ohne Druckveränderung beobachtet und gesehen hatte, daß die Änderung des innern Faktors beim Gasaustausch, die darin bestand, daß ich dem Blute die Möglichkeit der Sauerstoffaufnahme bis zu einem gewissen Grade nahm, die Symptome

gleichbleiben ließ, ging ich nun dazu über, beide Faktoren zugleich zu ändern. Ich brachte also die vorbereiteten Tiere in die Evakuationskammer, oder ließ CO gleichzeitig mit der Druckverminderung auf das Tier einwirken. Versuch 34 und 35 sind nach dem letzteren Modus durchgeführt, Versuch 36 bis 39 nach dem ersteren. Die Angabe der Zeiten zeigt nur, wie lange die Tiere der Einwirkung des CO ausgesetzt waren. Die Zahlen über Kohlensäure- und Sauerstoffgehalt sind auf die große Kammer bezogen.

Tabelle IX.

Kohlenoxyd in der Evakuierungskammer			Tiere unter einer kleinen Glocke mit CO vorbereitet		
Nr. des Versuches . . .	54	35	36	37	38
Tagesbarometer . . .	707	714	712	714	715
Absoluter Druck . . .	350	281	362	270	311
Reduzierter Druck . .	360	231,0	312,0	220,0	261,0
Kohlensäure in % . .	1,4	0,4	1,6	0,6	1,4
Sauerstoff in % . . .	18,6	19,3	19,4	19,6	19,2
Zeitdauer des Versuches oder d. Vorbehandlung	4′	3′	6′	2′ 40″	4′ 30″
CO in ccm	58	28,6	14,6	6,0	16,2
CO in %	0,4000	0,1972	0,3561	0,1463	0,3051
Sauerstoff-Partialdruck	55,80	44,58	60,53	43,12	50,17

Die Zeiten der CO-Behandlung sind alle so kurz, daß die Symptome nicht schon währenddem eintreten können. Ein Vergleich mit Tabelle VIII zeigt deutlich diese Tatsache. Betrachten wir die Versuche selbst, so bemerken wir eine starke Erhöhung des Partialdruckes. Diese Erscheinungen stimmen genau mit der Theorie überein, daß einzig der Sauerstoffmangel der maßgebende Faktor in den Erscheinungen bei vermindertem Luftdruck ist. Wir können die von mir beschriebenen Symptome nur dadurch erklären.

So sehen wir, daß auch diese letzten beiden Versuchsreihen in bezug auf ihre rechnerischen und symptomatologischen Resultate genau dasselbe Ergebnis aufweisen wie die frühern Versuche bei Druckverminderung.

Nachdem ich nun die Zustände bei vermindertem Luftdruck und Kohlenoxydvergiftungen in der Kammer untersucht hatte, trat die Frage an mich heran: Lassen sich die natürlichen Symptome der Bergkrankheit und diese Erscheinungen in der Kammer vergleichen und durch die chemische Theorie

ungezwungen erklären? In ihrer Abhandlung „Zur Kenntnis der Einwirkung des Hochgebirges auf den menschlichen Organismus“ legen Zuntz und Schumburg folgende Symptomatologie der Bergkrankheit nieder: „Jene Beobachter, die die Bergkrankheit in den Anden und dem Himalaya studiert haben, geben als wesentlichste Symptome an: Allgemeine Schwäche, Mattigkeit, Unfähigkeit, weitere Strapazen zu ertragen, ferner Übelkeit, die mit der Schwäche kombiniert ein Bild liefert, das an Seekrankheit erinnert; dazu treten deutliche Zeichen von mangelhafter Ernährung des Gehirns, Schwindel, benommenes Bewußtsein, Schwinden des Gesichts. Eine andere Gruppe von Erscheinungen, Blutung aus der Nase und andern Schleimhäuten, ferner die eigentümliche Entzündung der Haut gehören wohl nicht zu dieser Reihe von Erscheinungen, sie sind wohl zu erklären aus der starken Trocknung und Strahlenwirkung der Sonne“.

Die Symptome der allgemeinen Schwäche stimmen vollkommen mit dem Verhalten der Ratten überein, wenn sie sich auf den Bauch oder auf die Seite legen, indem sie dadurch selbst den Energieaufwand des Stehens vermeiden. Mangelnde Ernährung der Bewegungsorgane erklärt diese Erscheinung restlos. Cerebrale Affektionen sind wahrscheinlich bei der Ratte auch da, indem sie nach dem Luftschnappen in eine beliebige Lage auf den Boden zurückfällt, ferner sind Defäkation und Urinierung auf zentrale Erscheinungen zurückzuführen. Auch das Gehirn wird bei Sauerstoffmangel zu wenig ernährt und kann seine Abfallprodukte nicht herausschaffen. Alle die beschriebenen Hirnsymptome lassen sich durch den Sauerstoffmangel sehr gut erklären. Die Blutungserscheinungen aber sind wahrscheinlich nicht nur als Folge der starken Trockenheit und Strahlenwirkung der Sonne anzusehen, sondern sie beruhen wahrscheinlich zum großen Teil noch auf der von mir angeführten Erweiterung der Gefäße durch die mechanische Wirkung des niedern Luftdruckes.

Zusammengefaßt sind die Ergebnisse meiner Arbeiten die nachfolgenden:

1. Ratten, die in einer Kammer, die mit gewöhnlicher Luft gefüllt ist, vermindertem Druck ausgesetzt werden, zeigen krankhafte Erscheinungen, die Analogie mit der Bergkrankheit besitzen.

2. Diese krankhaften Symptome treten bei einem Barometerdruck ein, der durchschnittlich 209,92 mm Hg (reduziert 161,45 mm Hg) beträgt; der gasanalytisch ermittelte Sauerstoff-Partialdruck betrug durchschnittlich 27,68 mm Hg.

3. Wird die Kammer anstatt mit Luft mit reinem Sauerstoff gefüllt, so treten die krankhaften Symptome erst bei einem barometrischen Druck von 91,25 mm Hg (reduziert 41,25 mm Hg) ein, während der durchschnittliche Sauerstoff-Partialdruck 23,48 mm Hg betrug.

4. Wird in der Kammer die gewöhnliche Luft weitgehend durch Stickstoff ersetzt, so treten die krankhaften Symptome schon bei einem barometrischen Druck von 159,50 mm Hg ein, während der hierbei ermittelte Sauerstoff-Partialdruck 29,10 mm Hg beträgt.

5. Kohlenoxydvergiftungen mäßigen Grades zeigen ohne Änderung des barometrischen Druckes absolut die gleichen Symptome wie die Druckverminderung.

6. Mit CO vorbehandelte Tiere zeigen schon bei viel höheren Drucken als in den anderen Versuchsreihen die erwähnten Symptome.

7. Da in allen Versuchsreihen das mechanische Moment der barometrischen Druckverminderung äußerst variabel, der Sauerstoff-Partialdruck, bei dem die krankhaften Erscheinungen auftraten, annähernd konstant befunden wurde, folgt hieraus, daß die Sauerstoffverarmung das wesentliche Moment bei der Bergkrankheit sein dürfte.

8. Eine mechanische Wirkung auf die Lungengefäße scheint erst bei außerordentlich niedrigem Luftdruck manifest zu werden und scheint dann in günstiger Weise auf den Gasaustausch des Blutes in den Lungen zu wirken.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide XXI.

Über Silbersalzproteine.

Von

Wolfgang Pauli und Johann Matula.

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der K. K. Universität Wien.)

(Eingegangen am 19. Dezember 1916.)

Mit 10 Figuren im Text.

I.

Die chemisch und biologisch wichtige Frage der Salzeiweißverbindungen konnte bisher nur schrittweise ihrer Lösung näher gebracht werden, und auch die vorliegende Untersuchung, die sich organisch früheren Arbeiten am Institute anschließt, wird noch weiterer Fortsetzungen bedürfen, bis das Ziel erreicht ist.

Wohl hatten die bekannten Eiweißniederschläge mit Schwermetallsalzen den Gedanken an die Bildung chemischer Verbindungen nahegelegt, allein das völlige Versagen analytischer Methoden, die sowohl in den Händen desselben, wie verschiedener einwandfreier Untersucher[1]) inkonstante Ergebnisse lieferten, verwehrte jeden Einblick in die Struktur der Eiweißverbindungen mit Schwermetallsalzen. Der Grund der analytisch-chemischen Schwierigkeiten wurde mittels physikalisch-chemischer Methoden durch Pauli und L. Flecker[2]) aufgedeckt, die für die Zink-Ferri-Chrom-Kupfer- und Uranylsalze die Entstehung verschiedener Komplexsalze mit dem Eiweiß nach-

[1]) Vgl. Cohnheim, Chemie der Eiweißkörper, 3. Auflage, Braunschweig 1911, wo sich die ältere Literatur über den Gegenstand zusammengestellt findet.

[2]) Diese Zeitschr. **41**, 482, 1912.

weisen konnten, worauf auch die Erscheinung der Fällung, Wiederlösung und neuerlichen Fällung des Albumins durch diese Salze mit wachsender Konzentration derselben zurückzuführen war. Der Nachweis, daß die Schwermetallsalze an mehreren Stellen des Eiweißmoleküles mit demselben reagieren und daß auch Neutralsalze der Alkalimetalle, auf deren Anwesenheit frühere Untersucher meist nicht genug Bedacht genommen hatten, zum Auftreten neuer kombinierter Komplexe mit den Eiweiß-Schwermetallsalzen führen können, beleuchtet noch von anderer Seite die große Mannigfaltigkeit dieser Verbindungen.

Für die Frage nach dem Bestehen von Verbindungen der Neutralsalze der Alkali- und Erdalkalimetalle[1]) mit dem Eiweiß hatte sich bisher die Löslichkeit und Reversibilität dieser Kombinationen bei der Verdünnung und Dialyse als unvermeidliches Hindernis einer rein chemischen Behandlung erwiesen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wurde die Existenz dieser Gruppe von Neutralsalz-Eiweißverbindungen erschlossen aus einer Reihe geänderter Eigenschaften solcher Eiweißsalzmischungen.

Im Jahre 1899 wurde die Salzlöslichkeit des bekanntlich im reinen Wasser unlöslichen Globulins auf die Existenz einer wasserlöslichen Globulinsalzverbindung zurückgeführt [W. Pauli[2])] und in einer folgenden eingehenden Untersuchung am Serumalbumin gezeigt, daß dasselbe schon durch niedrigen Salzgehalt eine Herabsetzung der Viscosität sowie Hemmung der Alkoholfällbarkeit und Hitzegerinnbarkeit erfährt, die bei Zusatz von Nichtelektrolyten ausbleibt (Pauli und H. Handovsky).

Der direkte Beweis des Eintretens in das Eiweiß wurde jedoch erst 1913 für Chloride der Alkalien mittels elektrometrischer Chlorionenbestimmungen an unserem Institute erbracht [K. Manabe und J. Matula[3])] und durch eingehende Messungen an verschiedenen Eiweißkörpern und Aminosäuren quantitativ ausgebaut [T. Oryng und W. Pauli[4])]. Dabei hat

[1]) Die in hohen Konzentrationen gewisser Neutralsalze auftretende Eiweißfällung bildet ein selbständiges Untersuchungsgebiet, das hier nicht berührt werden soll.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **78**, 315, 1899.

[3]) Diese Zeitschr. **52**, 369, 1913.

[4]) Diese Zeitschr. **70**, 368, 1915.

es sich ergeben, daß das Chlor der Alkalichloride schon aus den niedersten Konzentrationen des Salzes weitgehend von Eiweiß aufgenommen wird, daß diese Bindung mit wachsender Konzentration relativ abnimmt und einem Grenzwerte zustrebt, der für 1%iges Albumin und Glutin in 0,05 n-Salzlösung nahezu erreicht wird, wobei die Bindung durch Glutin wesentlich hinter der des Albumins zurückbleibt. Da elektrophoretische Versuche nicht für das Auftreten einer Änderung der Eiweißladung durch Neutralsalzzusatz sprachen und auch viscosimetrische Untersuchungen gegen die merkliche Bildung des stark hydratisierten ionischen Eiweißes entscheiden, das sich (z. B. bei geringstem Laugen- und Säurezusatz) auf diesem Wege leicht erkennen läßt, so mußte die Annahme gemacht werden, daß diesen Neutralsalz-Eiweißverbindungen Anion und Kation des Salzes in dem gleichen Verhältnisse vorhanden sind.

Ein zwingender Beweis für diese Annahme wäre allerdings nur durch die gleichzeitige Bestimmung der Metall- und Anionen in Salzeiweißmischungen zu erbringen, ein Weg, der zur Zeit für die Alkali- und Erdalkali-Ionen nicht gangbar erscheint.

Wir haben in den vorliegenden Versuchen[1]) die Messung der Metallbindung an das Eiweiß für Silberionen durchgeführt und sind dabei von den folgenden Erwägungen ausgegangen. Zunächst zeigt das Albumin mit Silbersalz zusammengebracht, daß bei diesem einfachere Verhältnisse vorliegen als bei den oben erwähnten Schwermetallsalzen. Es tritt hier nämlich nur eine einzige Fällungszone mit wachsender Salzkonzentration auf, wobei es schon bei relativ niederem Salzgehalt zu einer vollständigen, im Salzüberschuß unlöslichen Eiweißflockung kommt. Auch sonst läßt sich kein Anhaltspunkt für die bei den meisten anderen Schwermetalleiweißfällungen auftretende Komplexsalzbildung (Eiweißsalz + Schwermetallsalz) finden. Wir haben ferner die Kombination von Silbersalz mit Glutin untersucht, da das letztere mit Schwermetallsalzen überhaupt keine Flockung gibt und sich nach unseren Versuchen gegen Silbersalz anscheinend in gleicher Weise verhält wie gegen Neutralsalze der Alkalien und Erdalkalien. Als dritte Eiweißtype wählten wir das wasserunlösliche Casein, das die Prüfung gestattete, wie

[1]) Bei diesen Untersuchungen hat Herr Dr. J. J. Zador in überaus dankenswerter Weise mitgewirkt.

weit unter diesen Umständen eine Reaktion mit dem Salze erfolgt.

II.

Die Bestimmung der Silberbindung an das Eiweiß geschah auf elektrometrischem Wege durch Feststellung der in der Lösung verbleibenden Silberionen. Zu diesem Zwecke wurde die elektromotorische Kraft einer Kette gemessen, die aus einer konstanten Bezugselektrode und der die Versuchsflüssigkeit enthaltenden Chlorsilberelektrode bestand.

Für diesen Fall ergibt die Nernstsche Theorie der Konzentrationsketten in ganz analoger Weise, wie dies Sörensen für die H-Ionenkette, K. Manabe und J. Matula[1]) für die Cl-Ionenkette durchgeführt haben, bei 18° die Formel

$$p_{Ag} = \log \frac{1}{C_p} = \frac{\pi_p - \pi_0}{0{,}0577} \quad \ldots\ldots \quad 1)$$

Hier bedeutet p_{Ag} den Silberionenexponenten, also $10^{-p_{Ag}}$ die Silberionenkonzentration ($= C_p$), π_p die gefundene elektromotorische Kraft und π_0 die elektromotorische Kraft einer Kette bestehend aus der Bezugselektrode und der Chlorsilberelektrode in einer Silberionenkonzentration $n = 1$.

Unsere erste Aufgabe war es, zunächst mit möglichster Genauigkeit den Wert π_0, also die der Silberionenkonzentration Eins in der Versuchselektrode entsprechende elektromotorische Kraft zu finden.

Bezüglich der technischen Ausführung sei nur das Notwendigste angeführt. Die Herstellung der Chlorsilberelektrode geschah in der von H. Jahn[2]) angegebenen Weise, indem ein Feinsilberdraht von 1 mm Dicke frisch galvanisch versilbert und durch Elektrolyse in Salzsäure chloriert wurde.

Bei vorsichtiger Abstufung der Stromstärke bedeckt sich der Draht mit einer gut haftenden Schicht von Chlorsilber.

Als konstante Ableitungselektrode diente ein Halbelement: Silber-Chlorsilber in 0,1 n-Silbernitratlösung. Die Verbindung zwischen beiden Elektroden wurde durch Eintauchen der Ableitungsrohre in ein mit

---

[1]) Bezüglich der Theorie der Messung und der bequemen Berechnung vgl. die kürzlich erschienene Schrift J. Matula, Tabellen zur elektrometrischen Bestimmung von Ionenkonzentrationen. Th. Steinkopff, Dresden 1917.

[2]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **33**, 556, 1900.

konzentrierter Kaliumnitratlösung gefülltes Schälchen bewirkt. Die Elektrodengefäße waren mit schwarzem Lack als Lichtschutz überzogen.

Die Ionenkonzentration der Versuchslösungen von bekanntem Silbernitratgehalt, die zur Bestimmung des π_0-Wertes dienten, wurde durch Berechnung des Dissoziationsgrades nach den von Kohlrausch angegebenen Zahlen für das Äquivalentleitvermögen des Silbernitrats bei verschiedenen Konzentrationen graphisch ermittelt[1]).

Nachdem als Ableitungselektrode eine mit 0,1 n gefüllte Silberelektrode diente, so muß bei Füllung der Meßelektrode mit 0,1 n-Silbernitrat die elektromotorische Kraft π_p der Kette gleich Null sein. Aus der diesem Falle für 20° entsprechenden Gleichung

$$\pi_0 = -0{,}0581 \log \frac{1}{C_p} \quad \ldots\ldots \quad 2)$$

kann somit der π_0-Wert auch ohne elektrometrische Messung abgeleitet werden. Er gründet sich lediglich auf die Leitfähigkeitsmessung, die den Wert C_p beistellt.

C_p ist in unserem Falle, da der Dissoziationsgrad einer 0,1 n-Lösung sich mit 0,8097 berechnet, gleich 0,08097 n. Setzen wir diesen Wert in obige Formel ein, so erhalten wir für π_0 den Wert — 0,06343 Volt.

Tabelle I.

Als konstante Bezugselektrode diente eine mit 0,1 n-$AgNO_3$-Lösung gefüllte Chlorsilberelektrode. T = 20°.

Versuchslösung	Ag^+-Konzentration	p_{Ag}	$0{,}0581 \log \frac{1}{C_{Ag}}$	Gefundene EMK π	π_0
0,05 n-$AgNO_3$	0,0427	— 1,3695	— 0,07957	0,0147	— 0,0649
0,05 „	0,0427	— 1,3695	— 0,07957	0,0152	— 0,0644
0,025 „	0,0223	— 1,6522	— 0,09699	0,0310	— 0,0660
0,02 „	0,0180	— 1,7441	— 0,10133	0,0354	— 0,0659
0,01 „	0,0925	— 2,0337	— 0,11815	0,0522	— 0,0660
0,01 „	0,0925	— 2,0337	— 0,11815	0,0532	— 0,0650
0,005 „	0,00472	— 2,3258	— 0,13513	0,098	— 0,0654
				Mittel	= — 0,0653
				π_0 berechnet für 20°	= — 0,0634

[1]) Kohlrausch-Holborn, Das Leitvermögen der Elektrolyte, Leipzig 1898, S. 159; neuere Zahlen siehe: Le Blanc, Elektrochemie 1911, S. 78.

Außerdem wurde die experimentelle Bestimmung des π_0-Wertes mit einer Reihe von Silbernitratlösungen von bekannter Konzentration nach der Formel 1 durchgeführt (Tabelle I).

Wie die Versuchsreihe zeigt, stimmen die erhaltenen π_0-Werte untereinander gut überein, erwiesen sich aber im Durchschnitt um etwa 2 Millivolt höher als der nach Formel 2 berechnete Wert. Diese Differenz fand sich auch in einer zweiten Versuchsreihe mit neuhergestellten Silberlösungen und bildet jedenfalls in unserer Versuchsanordnung eine Konstante, deren Wesen näher aufzuklären den Gegenstand besonderer Versuche bilden müßte[1]). Bei den folgenden Berechnungen wurde immer der experimentell gefundene Wert verwendet.

Die zur Berechnung der Silberionenkonzentration verwendete Formel lautete daher:

$$p_{Ag} = \frac{-\pi_p - 0{,}0653}{0{,}0581} \quad \ldots\ldots \quad 3)$$

Diese Formel gilt für 20°, bei welcher Temperatur alle Versuche ausgeführt wurden. Mit Hilfe der bei Ermittlung des π_0-Wertes gefundenen elektromotorischen Kräfte wurde die in Fig. 1 dargestellte Kurve konstruiert, welche die Abhängigkeit der elektromotorischen Kraft der Kette von der Silberionenkonzentration bei 20° wiedergibt. Als Ordinaten sind die elektromotorischen Kräfte, als Abszissen die Logarithmen der Silberionenkonzentration, also die Silberionenexponenten aufgetragen. Man kann mit Hilfe dieser Kurve, die in Fig. 1 verkleinert vorliegt, nach Ermittlung der elektromotorischen Kraft der Kette ohne weitere Rechnung den Silberionenexponenten auf 2 Dezimalstellen ablesen.

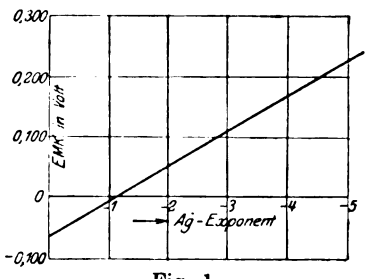


Fig. 1.

Die Bestimmung der elektromotorischen Kraft geschah nach der bekannten Poggendorfschen Kompensationsmethode. Es wurde eine verlängerte Meßbrücke (100 Ohm) und als Null-

[1]) Bezüglich Differenzen zwischen elektrometrisch und mittels Leitfähigkeit ermittelten Dissoziationsgraden vgl. H. Jahn, l. c.

instrument ein geschlossenes Quecksilber-Capillar-Elektrometer verwendet. Die Versuchselektrode muß, ehe man definitiv mißt, mehrere Stunden gefüllt stehen, da unmittelbar nach der Zusammenstellung noch keine Konstanz der elektromotorischen Kraft erreicht ist. Nach 2 bis 3 Stunden ist in den meisten Fällen der stabile Wert erreicht, nur bei ganz frisch chlorierten und gewaschenen Elektroden ist es nötig, eine längere Zeit (12 Stunden) abzuwarten.

Die an unseren Versuchslösungen ausgeführten Leitfähigkeitsmessungen geschahen nach der bekannten Methode von Kohlrausch mit der Wheatstoneschen Brücke, Telephon und Induktorium. Das Leitfähigkeitsgefäß wurde in einem Ostwaldschen Wasserthermostaten bei 25° gehalten. Die spezifische Leitfähigkeit berechnete sich nach der Formel: $K = \frac{C}{W}$, wobei C die Kapazität des Gefäßes bedeutete, die in unserem Falle 2,01441[1]) betrug. Das Leitfähigkeitsgefäß wurde immer mit 25 ccm der Versuchsflüssigkeit gefüllt.

III.

Zunächst wurde versucht, die Bindung des Silbers an Glutin nachzuweisen und festzustellen, wie sich dieselbe bei wechselnder Silberionenkonzentration verhält. Das verwendete Glutin (beste Handelsmarke von Gelatine) war vorher mehrere Wochen gegen destilliertes Wasser bei ca. 10° dialysiert worden. Aus dem so erhaltenen 7%igen Glutin wurde durch Verdünnung mit destilliertem Wasser eine 2%ige Stammlösung hergestellt. Ein Teil dieser Stammlösung wurde mit dem gleichen Volumen Silbernitratlösung verdünnt, so daß die Versuchsproben stets 1% Glutin enthielten. Die verschiedenen Konzentrationen von Silbernitrat wurden durch entsprechende Verdünnung einer 0,2 n-Silberlösung gewonnen. Um Verdünnungsfehler möglichst auszuschalten, wurde auch in den entsprechenden reinen Salzlösungen die Silberionenkonzentration elektrometrisch bestimmt.

Für die Berechnung des an das Glutin gebundenen Silbers wurde folgender Weg eingeschlagen:

---

[1]) Dieselbe war durch Messungen verschiedener Standardlösungen exakt kontrolliert.

Wie aus den Versuchen zu ersehen ist, findet tatsächlich eine Verminderung der Silberionenkonzentration in den mit Glutin versetzten Lösungen statt. Die elektrometrisch bestimmte Menge der freien Silberionen entspricht aber nicht der gesamten Menge des freien Silbernitrats, da ja das Salz nicht vollständig dissoziiert ist. In Wirklichkeit ist, wenn die gefundene Ionenkonzentration in der reinen Salzlösung C beträgt, die Gesamtkonzentration $\frac{C}{\alpha}$, wobei α den Dissoziationsgrad bedeutet. Wäre nun die Silberionenkonzentration in der Glutinsalzmischung C' und der entsprechende Dissoziationsgrad α', so wird die Menge des gesamten verschwundenen, d. h. an das Glutin gebundenen Silbers $\frac{C}{\alpha} - \frac{C'}{\alpha'}$ betragen. Eine umständliche Berechnung von α' erwies sich als überflüssig, da in der Mehrzahl der Fälle die Bindung an das Glutin so gering ist, daß keine nennenswerte Änderung des Dissoziationsgrades der Silberlösung erfolgt und α' praktisch durch α ersetzt werden kann. Die Formel, nach der das gebundene Silber bestimmt wurde, lautet also:

$$Ag_{geb} = \frac{C - C'}{\alpha}.$$

Nachstehend seien die den verwendeten Silbernitratkonzentrationen entsprechenden Werte des Dissoziationsgrades α für reine Silbernitratlösung angegeben, wie sie sich aus dem Äquivalenzleitvermögen ermitteln lassen.

C_{AgNO_3}	α	C_{AgNO_3}	α
0,025 n	0,9670	0,03 n	0,8814
0,005 „	0,9445	0,03 „	0,8669
0,01 „	0,9253	0,05 „	0,8540
0,02 „	0,9013	0,1 „	0,8097

Die Ergebnisse der potentiometrischen Versuche sind in den folgenden Tabellen IIa und IIb zusammengestellt. Alle Werte sind auf den Liter Lösung bezogen.

In der Tabelle IIa sind die elektrometrisch gefundenen Silberionenkonzentrationen C_{Ag} der reinen Salzlösungen und in der Tabelle IIb jene der 1% Glutin enthaltenden Silbernitratlösungen verzeichnet. In der letzten Rubrik der Tabelle IIb

ist das gebundene Silber angegeben. Sonst bedeuten in den Tabellen π die gefundene elektromotorische Kraft ausgedrückt in Volt, P_{Ag} den Silberionenexponenten, der mit negativem Vorzeichen einzusetzen ist.

Tabelle IIa.

Reine Silbersalzlösung.

Versuchslösung $AgNO_3$	π	P_{Ag}	C_{Ag}
0,0025 n	0,0842	2,5745	0,002663
0,005 „	0,0698	2,3251	0,004729
0,01 „	0,0532	2,0399	0,009121
0,02 „	0,0347	1,7218	0,01897
0,05 „	0,0162	1,4034	0,03949

Tabelle IIb.

1% Glutin + Silbernitrat.

Lösung von 1% Glutin + $AgNO_3$	π	P_{Ag}	C_{Ag}	n-Ag gebunden
0,0025 n-$AgNO_3$	0,0924	2,7155	0,001925	0,000763
0,005 „	0,0748	2,4127	0,003866	0,000914
0,01 „	0,0568	2,1024	0,007898	0,001322
0,02 „	0,0367	1,7557	0,01755	0,001576
0,05 „	0,0174	1,4237	0,03769	0,002108

Graphisch dargestellt ist das Ergebnis in Fig. 2a. Als Abszissen sind die Konzentrationen des Silbernitrats, als Ordinaten die daraus gebundene Silbermenge aufgetragen. Wie die Versuchsreihe ersehen läßt, steigt die Menge des gebundenen Silbers mit der Konzentration des Silbernitrats zunächst schnell, dann langsamer an, um einem konstanten Werte zuzustreben.

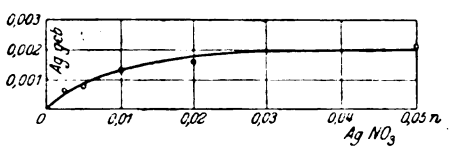


Fig. 2a.

Konzentrationen über 0,05 n konnten elektrometrisch nicht untersucht werden, da in diesen Lösungen selbst größeren Konzentrationsänderungen nur geringe Änderungen der elektromotorischen Kraft entsprechen, so daß hier kleine Versuchsfehler bei der Messung schon sehr ins Gewicht fallen.

Aus den Versuchen errechnet sich ein Bindungsmaximum von rund $2 \cdot 3 \cdot 10^{-4}$ Grammäquivalenten Silber auf 1 g Glutin.

Nach dem Ausfall der elektrometrischen Versuche waren der Bindung des Silbersalzes an das Glutin entsprechende Änderungen der elektrischen Leitfähigkeit in Glutinsilbersalzmischungen zu erwarten. Das Versuchsergebnis von Parallelbestimmungen der Leitfähigkeit von Silbersalz und Silbersalzglutinmischungen ist in Tabelle III und Fig. 2b verzeichnet.

Tabelle III.

Spezifische Leitfähigkeit von 1% Glutin ohne Zusatz: 0,0000386.

$AgNO_3$-Konzentration der Versuchslösung	Spezifische Leitfähigkeit ($\varkappa$) der puren Lösung	Spezifische Leitfähigkeit ($\varkappa_1$) bei 1% Glutingehalt	$\varkappa - \varkappa_1 + 0{,}0000386$
0,0025 n	0,0003240	0,0003029	0,0000597
0,005 „	0,0006387	0,0005961	0,0000812
0,01 „	0,001246	0,001167	0,0001176
0,02 „	0,002389	0,002246	0,000182
0,05 „	0,005863	0,005542	0,000360

In der letzten Rubrik der Tabelle III ist die Verminderung der Leitfähigkeit der Silberlösung bei Zusatz von Glutin angegeben. Da aber unsere 1%ige Glutinlösung eine, wenn auch geringe — von mineralischen Beimengungen stammende — Leitfähigkeit besitzt (sie beträgt für unsere Lösung $3{,}86 \cdot 10^{-5}$), so wurde ihr Wert als Korrektur zur Differenz der beiden Leitfähigkeiten addiert. Die Leitfähigkeitsverminderung erweist sich in ihrem Gange parallel dem elektrometrisch festgestellten Verschwinden von Silberionen. Graphisch dargestellt ist das Versuchsergebnis in Fig. 2b.

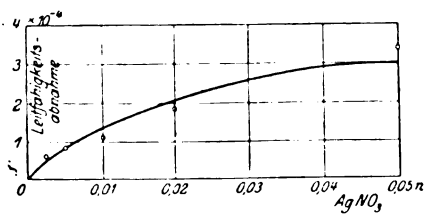


Fig. 2b.

Wir haben weiter einige Beobachtungen über den Einfluß der Glutinkonzentration auf die Silberbindung angeschlossen, die sämtliche sowohl nach der elektrometrischen als auch der Leitfähigkeitsbestimmung erkennen lassen, daß mit steigendem Glutingehalt die relative Bindung des Silbers merklich unter

der proportionalen Zunahme zurückbleibt. Dieses Verhalten zeigt sich übereinstimmend sowohl in niederen als auch in etwas höheren Silbersalzkonzentrationen (Fig. 3a, b).

Tabelle IVa.

Glutin + 0,0025 n-$AgNO_3$, Elektrometrie.

Endkonzentration	π	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag (geb.)
0,0025 n-$AgNO_3$	0,08595	2,6040	0,002489	—
0,0025 „ + 0,68% Glutin	0,09224	2,7123	0,001940	0,000568
0,0025 „ + 2,01% „	0,10350	2,9060	0,001242	0,001290
0,0025 „ + 3,4% „	0,11577	3,1000	0,000793	0,001754

Tabelle IVb.

Dasselbe, Leitfähigkeitsmessung.

Endkonzentration	$\varkappa$	$\varkappa_1$ des reinen Glutins	Leitfähigkeitsabnahme
0,0025 n-$AgNO_3$	0,0003223	—	—
0,0025 „ + 0,68% Glutin	0,0003116	0,0000244	0,0000351
0,0025 „ + 2,01% „	0,0002927	0,0000565	0,0000861
0,0025 „ + 3,4% „	0,0002792	0,0000832	0,0001263

Auch in einer viermal höheren Silbernitratkonzentration findet das relative Zurückbleiben der Silberbindung mit wachsendem Glutingehalt statt, wie sowohl die elektrometrischen als auch die Leitfähigkeitsmessungen in den folgenden Tabellen Va

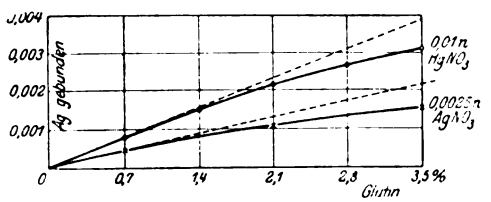


Fig. 3a.

und Vb dartun; doch ist hier diese Erscheinung weniger ausgiebig als bei der schwächeren Silbersalzlösung. Die zugehörigen Kurven in den Fig. 3a, b lassen diesen Unterschied deutlich erkennen.

Mit zunehmendem Glutingehalt wächst also die Silberbindung nicht einfach proportional der Glutinkonzentration, sondern bleibt gegen den linearen Anstieg deutlich zurück. Diese Abweichung ist nun auffallenderweise in den Versuchen

mit geringerer Silbersalzkonzentration erheblich größer als bei höherer. Man wird daher nicht fehlgehen, diese Erscheinung auf die hydrolytische Zerlegung der Protein-Silbersalzverbindung zu beziehen, die um so mehr wächst, je geringer der Überschuß freien Salzes in der Lösung wird, der einer hydrolytischen Dissoziation entgegenwirkt.

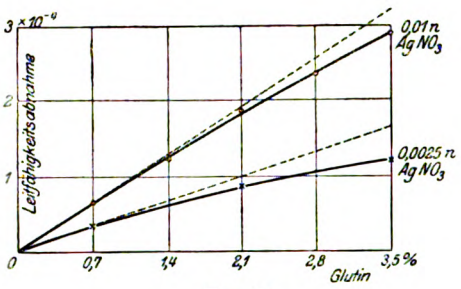


Fig. 3b.

Tabelle Va.

Glutin + 0,01 n-$AgNO_3$, Elektrometrie.

Endkonzentration	π	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag (geb.)
0,01 n-$AgNO_3$	0,05269	2,0315	0,009302	—
0,01 „ + 0,68% Glutin .	0,05476	2,0671	0,008569	0,000788
,01 „ + 1,36% „ .	0,05683	2,1027	0,007894	0,001514
0,01 „ + 2,04% „ .	0,05886	2,1411	0,007226	0,002232
0,01 „ + 2,72% „ .	0,06050	2,1659	0,006824	0,002665
0,01 „ + 3,4% „ .	0,06257	2,2015	0,006288	0,003241
0				

Tabelle Vb.

Glutin + 0,01 n-$AgNO_3$, Leitfähigkeit.

Endkonzentration	$\varkappa$	$\varkappa'$ reine Glutinlösung	Leitfähigkeitsabnahme + $\varkappa'$
0,01 n-$AgNO_3$	0,0012451	—	—
0,01 „ + 0,68% Glutin .	0,0012028	0,0000244	0,0000667
0,01 „ + 1,36% „ .	0,0011569	0,0000405	0,0001287
0,01 „ + 2,04% „ .	0,0011180	0,0000565	0,0001836
0,01 „ + 2,72% „ .	0,0010746	0,0000699	0,0002404
0,01 „ + 3,4% „ .	0,0010356	0,0000832	0,0002027

Zu den Glutinversuchen wäre noch zu bemerken, daß das Silbersalz keinerlei Fällung bewirkt, auch wenn man noch so hohe Konzentrationen anwendet. Ebenso wird die Viscosität der Glutinlösung bei Zusatz von Silbernitrat, wie anderweitige Versuche ergeben haben [1]), nicht merklich geändert.

[1]) Siehe die demnächst erscheinende, folgende Mitteilung über die Hydratation der Salzeiweißverbindungen.

IV.

Unser Albumin wurde aus frischem Rinderserum gewonnen, indem dieses durch Halbsättigung mit Ammonsulfat von der Globulinfraktion befreit und das Filtrat durch Ganzsättigung mit Ammonsulfat ausgeflockt wurde. Darauf wird der Niederschlag abgepreßt und zur Befreiung von den Salzen einer $2^1/_2$ Monate dauernden Dialyse gegen destilliertes Wasser unterzogen. Der Albumingehalt der so erhaltenen Lösung betrug $1{,}4\,\%$, und da in allen Versuchen Verdünnung mit den gleichen Mengen Silbernitratlösung vorgenommen wurde, war der Eiweißgehalt in allen Versuchslösungen $0{,}7\,\%$. Mit Silbernitrat von niederer Konzentration versetzt, blieb die Lösung zunächst vollkommen klar und durchsichtig, erst bei einer Silbernitrat-Endkonzentration von 0,04 n trat eine leichte Trübung der Lösung ein, die sich bei steigender Konzentration rasch verstärkte. Bei ungefähr 0,07 n ist die Ausfällung des Albumins quantitativ, wobei es sich als schwerer weißer Niederschlag absetzt, während die darüberstehende Flüssigkeit vollständig wasserklar ist. Die analog den Versuchen an Glutin durchgeführten elektrometrischen und Leitfähigkeitsmessungen sind in den Tabellen VI, VII und X verzeichnet. Die entsprechende graphische Darstellung bilden die voll ausgezogenen Kurven in Fig. 4a und 4b.

Tabelle VI.

Silberionengehalt von reinem $AgNO_3$.

	π (Volt)	P_{Ag}	C_{Ag}
0,0025 n-$AgNO_3$ . .	0,08424	2,5745	0,002663
0,005 „ . .	0,06961	2,3217	0,004767
0,01 „ . .	0,05319	2,0401	0,009116
0,02 „ . .	0,03549	1,7339	0,01845
0,03 „ . .	0,02414	1,5760	0,02654
0,05 „ . .	0,01583	1,3971	0,04101

Tabelle VII.

$0{,}7\,\%$ Albumin + $AgNO_3$.

$0{,}7\,\%$ Albumin +	π (Volt)	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag gebunden
0,0025 n-$AgNO_3$ . .	0,09080	2,6874	0,002054	0,000630
0,005 „ . .	0,07431	2,4036	0,003948	0,000867
0,01 „ . .	0,05628	2,0932	0,008067	0,001134
0,02 „ . .	0,03746	1,7693	0,01701	0,001598
0,03 „ . .	0,02941	1,6192	0,02403	0,002847
0,05 „ . .	0,01789	1,4325	0,03693	0,004777

Im wesentlichen findet sich auch hier ein Anstieg der Bindung und entsprechend eine fortschreitende Abnahme der Leitfähigkeit mit wachsender Silberkonzentration bis ungefähr 0,05 n. Bei weiterer Erhöhung des Gehaltes an Silbersalz bleibt die Bindung konstant. Die von 1 g Albumin höchstgebundene Menge Silber stellt sich auf rund $5 \cdot 10^{-4}$ Grammäquivalente.

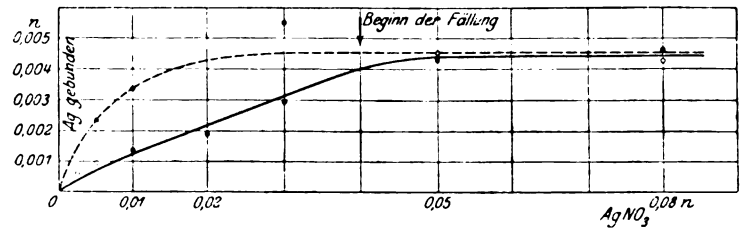


Fig. 4a.

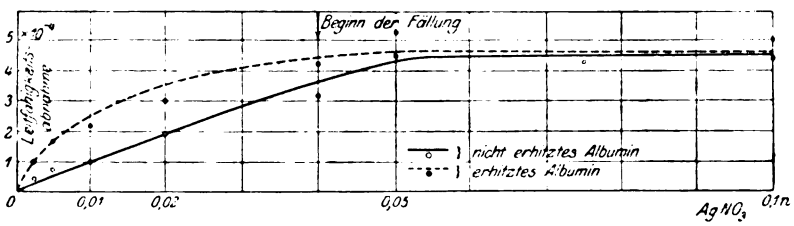


Fig. 4b.

Im Gegensatz zum Glutin erfährt Albumin beim Erhitzen die bekannte Denaturierung. Erwärmen über 60° bewirkte Koagulation der 0,7%igen Albuminlösung. Es war unter diesen Umständen von Interesse, festzustellen, wie die Silberbindung durch Erwärmen der Salzeiweißmischung beeinflußt wird. (Tabelle VIII.) Dabei zeigte sich, daß der Zusatz von Silbernitrat, wie aus älteren Untersuchungen von Pauli für Neutralsalze schon bekannt war, die sichtbare Hitzekoagulation des Albumins verhindert, und auch in jenen Konzentrationen, wo der Zusatz des Silbernitrats Fällung hervorruft, wird durch Erhitzen keine erkennbare Vermehrung der bestehenden Trübung oder Fällung bewirkt. Nur bei sehr niedrigem Silbernitratgehalt (unter 0,01 n) ist die Hemmung der Hitzekoagulation unvollständig. Hier findet sich nur eine Trübung des Albumins an Stelle der grobflockigen vollständigen Gerinnung der salzfreien Eiweißlösung.

Das Ergebnis der elektrischen Messungen ist in Tabelle IX und in den entsprechenden Rubriken von Tabelle X verzeichnet, sowie durch die gestrichelten Kurven in Fig. 4a und 4b dargestellt.

Tabelle VIII.

Fällungsversuche.

4 ccm 0,7% Albumin enthaltend		Nach Zusatz von 2 ccm 4 n-$NaNO_3$	Nach Zusatz von 2 ccm 4 n-$Mg(NO_3)_2$
0,000 n-$AgNO_3$	klar	klar	klar
0,005 „	„	„	„
0,01 „	„	„	„
0,02 „	„	zarte Trübung	„
0,03 „	„	grobflockige starke Trübung	Opalescenz
0,04 „	feine Trübung	do.	Verstärkung der schon bestehenden Trübung

Hitzekoagulation.

4 ccm 0,7% Albumin enthaltend	Veränderung beim Erhitzen	Nach Zusatz von 2 ccm 4 n-$NaNO_3$	Nach Zusatz von 2 ccm 4 n-$Mg(NO_3)_2$
0,000 n-$AgNO_3$	vollständige Ausflockung	do.	do.
0,005 „	zarte Trübung	zunehmende Niederschläge, die sich vollständig flockig absetzen	undurchsicht. Trübung (nicht flockig)
0,01 „	spurenweise Trübung		schwere, sich absetzende flockige Niederschläge
0,02 „	klar		
0,03 „	„		
0,04 „	schon bestehende Kältetrübung wird durch Erhitz. **nicht** verstärkt		

Tabelle IX.

Bestimmungen der Ag-Ionen in auf 100° erhitzter Lösung von 0,7% Albumin + $AgNO_3$.

0,7% Albumin	π	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag gebunden
0,005 n-$AgNO_3$	0,08402	2,5707	0,002687	0,002171
0,01 „	0,06245	2,2096	0,006171	0,003183
0,02 „	0,03873	1,7912	0,01617	0,002529
0,05 „	0,01767	1,4287	0,03726	0,004391
0,08 „	0,00623	1,2318	0,05864	0,004469

Tabelle X.

Elektrische Leitfähigkeit einer Lösung von 0,7% Albumin + $AgNO_3$ vor und nach dem Erhitzen. Verdunstung berücksichtigt.

$AgNO_3$	Reine Salzlösung $\varkappa$	0,7% Albumin $\varkappa_1$	Nach Kochen $\varkappa_2$	$(\varkappa - \varkappa_1)$ + 0,000044	$(\varkappa - \varkappa_2)$ + 0,000044
0,0025 n	0,0003240	0,0003112	0,0002826	0,0000568	0,0000854
0,005 „	0,0006387	0,0005967	0,0005321	0,0000860	0,000151
0,01 „	0,001246	0,001166	0,001074	0,0001200	0,000216
0,02 „	0,002389	0,002257	0,002166	0,000176	0,000267
0,04 „	0,004699	0,004440	0,004339	0,000293	0,000413
0,05 „	0,005863	0,005470	0,005376	0,000487	0,000539

Es zeigt sich also, daß durch das Kochen eine ganz bedeutende Steigerung der Bindung von Silber an das Albumin in den niederen Konzentrationen bis gegen 0,05 n bewirkt wird, daß aber die maximale Bindung sich nicht über jene des ungekochten Albumins erhebt. Es wird also durch das Kochen der maximale Bindungsgrad schon in niedrigeren Konzentrationen erreicht. Analoge Versuche mit Glutin und Casein ausgeführt, ergaben dagegen, wie die elektrometrische Bestimmung und die Leitfähigkeitsmessung lehrte, bei diesen Proteinen keine Spur einer veränderten Silberbindung durch Erhitzen.

So hatte beispielsweise die spezifische Leitfähigkeit einer 1%igen Glutinlösung, die 0,005 n-$AgNO_3$ enthielt, vor und nach dem Erhitzen auf 100° den Wert $0{,}595 \cdot 10^{-8}$.

V.

Das Casein[1]) ist im Gegensatz zu Glutin und Albumin in reinem Wasser praktisch gar nicht und auch in neutralen Salzlösungen sehr wenig löslich. Es war von Interesse zu prüfen, ob es trotzdem Silber zu binden vermag. Zu diesem Zwecke wurde in je 50 ccm der verschiedenen Silbernitratkonzentrationen je 1 g Casein suspendiert. Diese Suspension wurde in einem Schüttelapparat 4 bis 5 Stunden energisch bewegt. In dieser Zeit war das Bindungsgleichgewicht erreicht, da ein

[1]) Das zu den Messungen verwendete Präparat war aschefreies reinstes Casein „Merk", das sich in früheren Versuchen mit reinstem, nach Hammarsten dargestelltem Kuhmilchcasein bei einer eingehenden Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften als gleichwertig erwiesen hatte. [Diese Zeitschr. 70, 489 (1915)].

längeres Schütteln bis 24 Stunden und darüber an dem Schlußergebnis nichts ändert. Dabei geht ein Teil des Caseins in mehr oder minder kolloide Lösung, was schon an einer opalescenten Trübung und ziemlichen Schaumbildung derselben zu erkennen ist. Die gelöste Menge betrug bei Zimmertemperatur 0,06 g Casein in 50 cm^3 0,01 n-$AgNO_3$.

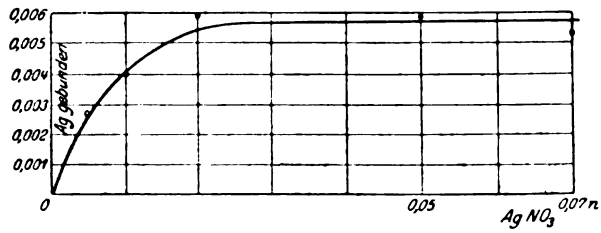


Fig. 5a.

Sonst war die Versuchsanordnung die gleiche wie beim Glutin. Die Bindung wurde elektrometrisch und mittels Messung der Leitfähigkeit verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XIa, XIb und XII, sowie in den entsprechenden Fig. 5a und 5b wiedergegeben.

Tabelle XIa.

Reine Silbernitratlösungen.

Versuchslösung	π Volt	P_{Ag}	C_{Ag}
0,005 n-$AgNO_3$	0,06961	2,3217	0,004767
0,01 „	0,05305	2,0377	0,009167
0,02 „	0,03549	1,7339	0,01845
0,05 „	0,01620	1,4034	0,03949
0,06 „	0,005194	1,2139	0,06110

Tabelle XIb.

1 g Casein wurde in 50 ccm $AgNO_3$-Lösung aufgeschwemmt und 4 Stunden geschüttelt.

Versuchslösung	π Volt	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag gebunden
0,005 n-$AgNO_3$ + Casein	0,08913	2,6587	0,002194	0,002708
0,01 „ + „	0,06632	2,2661	0,005418	0,004052
0,02 „ + „	0,04467	1,8934	0,01278	0,006291
0,05 „ + „	0,01932	1,4571	0,03490	0,005760
0,07 „ + „	0,006858	1,2427	0,05718	0,004731

Tabelle XII.

Elektrische Leitfähigkeiten.

$AgNO_3$-Konzentration	Spez. Leitfähigkeit der reinen Lösung ($\varkappa$)	Spez. Leitfähigkeit bei Suspension von 1 g Casein ($\varkappa_1$)	$\varkappa - \varkappa_1$
0,005 n	0,0006387	0,0004936	0,0002451
0,01 „	0,001246	0,001013 0	0,0002330
0,02 „	0,002389	0,002081	0,000308
0,05 „	0,005863	0,005275	0,000598
0,01 „	0,010958	0,010268	0,000690

Aus den Versuchen geht hervor, daß auch das Casein Silber bindet und zwar in niedrigen Konzentrationen in viel erheblicherem Maße, als es bei Glutin der Fall war. Die Bindung wächst wieder anfangs mit der Konzentration des Silbersalzes, um dann in höheren Konzentrationen desselben konstant zu bleiben.

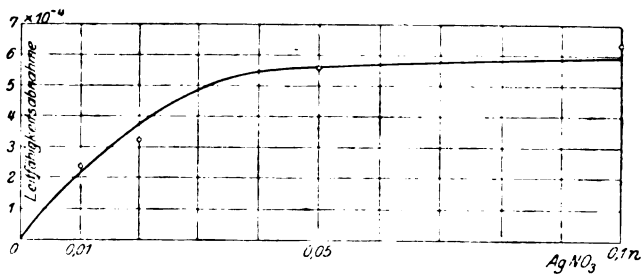


Fig. 5b.

Es entsteht nun die Frage, ob sich die Bindung nur auf das gelöste oder auch auf das ungelöste Casein erstreckt, das die weit überwiegende Menge bildet. Wenn auch das erstere in Anbetracht der geringen Mengen des gelösten Caseins nicht gerade wahrscheinlich ist, so ist doch diese Möglichkeit angesichts des bei anderer Gelegenheit festgestellten bedeutenden Bindungsvermögens von Casein für Alkali nicht ganz von der Hand zu weisen. Es wurde daher ein Versuch ausgeführt, bei dem in 50 ccm einer 0,02 n-Silbernitratlösung sowohl 1 g, als auch 2 g Casein suspendiert wurden. Würde das Silber bloß vom gelösten Casein gebunden, so war keine weitere Vermehrung der Silberaufnahme bei erhöhtem Zusatz von Casein zu erwarten, da bei dem großen Überschuß von unlöslichem Casein beide Lösungen als gesättigt anzusehen sind.

Tabelle XIII.

50 ccm 0,02 $AgNO_3$ versetzt mit	π	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag gebunden
1 g Casein	0,04467	1,8934	0,01278	0,006291
2 „ „	0,05173	2,0150	0,009659	0,009743

Wie aus Tabelle XIII zu ersehen ist, findet bei höherem Caseingehalt der Aufschwemmung eine erhebliche Mehrbindung von Silber statt. Wenn diese auch weniger als das Doppelte beträgt, so darf dennoch mit Sicherheit angenommen werden, daß auch das ungelöste Casein, und zwar in bedeutendem Maße, an der Silberbindung beteiligt ist.

VI.

Für die Beurteilung der Beziehungen zwischen Silbersalzproteinen und den bekanntlich reversiblen Alkalisalzeiweiß-Verbindungen ist die Prüfung der Reversibilität der Glutinsilbersalz-Kombination von Wichtigkeit. Auf das Bestehen dieser Reversibilität weist schon die weitgehende Löslichkeit des Silbersalzglutins mit einiger Wahrscheinlichkeit hin. Man kann in der Tat leicht feststellen, daß die andauernde Dialyse des Silbersalzglutins bis zum Verschwinden der Silberreaktion in der Außenflüssigkeit wieder ein Glutin von unveränderten Eigenschaften liefert. Sowohl die gegen den geringsten Leimabbau hochempfindliche Erstarrfähigkeit, wie auch die viscosimetrische Reaktion als Säureglutin erwies sich bei der durch Auswaschen des Silbersalzes gewonnenen Glutinsubstanz als ganz unberührt. Es liefert also auch die hydrolytische Dissoziation des Silbersalzglutins bei Verdünnung das ursprüngliche Protein.

Danach war auch zu erwarten, daß Silbersalzglutin mit anwesendem Neutralsalz von Alkali- oder Erdalkalimetallen in ein reversibles Gleichgewicht tritt, wobei, abhängig von der Masse des anwesenden Alkali- oder Erdalkalimetalles, das Silber aus seiner Verbindung mit dem Glutin verdrängt werden müßte. Wie die folgenden Versuche zeigen, trifft dieses Verhalten tatsächlich zu.

Zum Nachweise der abnehmenden Silberverbindung mit steigendem Neutralsalzzusatz wurden einer Mischung von 1 %

Glutin + 0,01 n-$AgNO_3$ wachsende Mengen von Natrium- und Bariumnitrat hinzugefügt. Die freien Silberionen wurden wie oben elektrometrisch ermittelt und daraus das gebundene Silber berechnet. Die in der Kombination der Nitrate in Abwesenheit von Glutin bestehende Silberionisation wurde für Natriumnitrat rechnerisch nach Arrhenius, für Bariumnitrat potentiometrisch gewonnen. Die entsprechenden Dissoziationsgrade stimmen, wie die Tabellen XIII, XIV erkennen lassen, in den niederen Konzentrationen erwartungsgemäß überein.

Tabelle XIII.

Dissoziationsgrade von
0,01 n-$AgNO_3$ + n-$NaNO_3$.

n-$NaNO_3$	α berechnet
0,0	0,925
0,01	0,901
0,025	0,874
0,05	0,844

Tabelle XIV.

0,0094 n-$AgNO_3$ + n-$Ba(NO_3)_2$.

n-$Ba(NO_3)_2$	π	P_{Ag}	C_{Ag}	α des $AgNO_3$
0,0	0,05440	2,0609	0,008692	0,925
0,01	0,05500	2,0713	0,008486	0,902
0,05	0,05725	2,1100	0,007763	0,835
0,1	0,05847	2,1310	0,007396	0,788

Die Silberbindung an das Glutin mit steigendem Neutralsalzzusatz ist aus den folgenden elektrometrischen Messungen der Tabellen XV, XVI zu ersehen.

Tabelle XV.

0,01 n-$AgNO_3$ + 1% Glutin + n$NaNO_3$.

n-$NaNO_3$	π	P_{Ag}	C_{Ag}	α	Ag (geb.)
0,0	0,05678	2,1021	0,007905	0,925	0,001879
0,01	0,05686	2,1033	0,007884	0,901	0,001838
0,025	0.05833	2,1285	0,007440	0,874	0,001490
0,05	0,05856	2,1325	0,007371	0,944	0,001220

Ein Blick auf die letzten Kolonnen der Tabellen XV, XVI zeigt die steigende Silberverdrängung aus der Glutinverbindung mit wachsendem Zusatz von Alkali- und Erdalkalisalz.

Tabelle XVI.

$0{,}0094\,AgNO_3 + 1\,\%$ Glutin + n-$Ba(NO_3)_2$.

n-$Ba(NO_3)_2$	π	P_{Ag}	C_{Ag}	Ag (geb.)
0,0	0,05854	2,1317	0,007385	0,001415
0,01	0,05924	2,1443	0,007173	0,001454
0,05	0,06000	2,1573	0,006962	0,000970
0,1	0,06103	2,1750	0,006684	0,000926

Nach den bisher angeführten Beobachtungen kann kein Zweifel bestehen, daß die Silbersalzglutinverbindung in ganz analoger Weise reversibel ist, wie etwa ein Alkalisalzprotein.

Die Beziehungen zwischen Silbersalz- und Alkalisalzprotein reichen noch weiter.

Aus den Untersuchungen von Oryng und Pauli berechnet sich für die Bindung von KCl an 1% Glutin eine maximale Aufnahme von rund $2{,}2.10^{-4}$ Grammäquivalenten Chlor auf ein Gramm Glutin. Praktisch den gleichen Wert erreicht in unseren Versuchen die maximale Bindung von Silber für ein Gramm Glutin aus Silbernitrat.

Ferner hatten wir gefunden, daß mit wachsendem Glutingehalt in niederen Konzentrationen des Silbersalzes die Silbersalzbindung tiefer bleibt als der linearen Abhängigkeit vom Glutingehalt entspricht, eine Erscheinung, in der wir den Ausdruck einer hydrolytischen Dissoziation des Salzproteins erblicken. Eine vollkommen parallele Erscheinung haben Oryng und Pauli für die Abhängigkeit der Chlorbindung von der Proteinkonzentration beim Salzprotein beschrieben[1]).

Aber auch das bei hoher Silberaufnahme wasserunlösliche Silbersalzalbumin verhält sich ganz analog den löslichen Alkalisalzalbuminen. Schon eingangs waren die Unterschiede im allgemeinen Verhalten des Silbersalzalbumins gegenüber der von Pauli und Flecker aufgeklärten Doppelsalzbildung bei gewissen anderen Schwermetallspalzproteinen hervorgehoben worden. Entsprechend dem besonderen Verbindungstypus ist in den letzteren Fällen die maximale Metallbindung eine weit höhere. So ergibt sich aus den Versuchen von Pauli und Flecker bei Ferrisalz eine Höchstaufnahme von rund $1{,}6.10^{-3}$ Gramm-

[1]) l. c., S. 385.

äquivalenten Eisen auf ein Gramm Albumin. Dagegen bindet das Albumin aus Silbersalz nach unseren Messungen etwas weniger als ein Dreißigstel der Eisenmenge, nämlich nur rund 5.10^{-4} Grammäquivalente Silber pro Gramm Eiweiß. Den gleichen Wert ergab wiederum die Chlorbindung in der reversiblen Alkalisalzalbuminverbindung nach den Messungen von Oryng und Pauli. Gegenüber Alkali- und Silbersalzen ist also nicht nur dem Sinne nach ein übereinstimmendes Verhalten von Glutin und Albumin zu finden bei der Bindung des anionischen Bestandteiles der ersteren und des kationischen der letzteren, sondern es besteht auch eine vollkommene Äquivalenz der gebundenen Mengen in beiden Fällen.

Die vorliegenden Zusammenhänge treten schließlich auch bei elektrischen Konvektionsprüfungen deutlich hervor.

Die beim Zusammenbringen von Ferri-Chromi-Uranyl- usw. Salzen mit Albumin eintretende Komplexsalzbildung, die durch Auftreten eines komplexen, das Protein enthaltenden elektropositiven Ions charakterisiert ist, äußert sich als Wanderung des Eiweißes zum negativen Pole.

Dagegen bleibt bei den Eiweißverbindungen der Alkalisalze — von der entladenden Wirkung hohen Salzüberschusses abgesehen — der Ladungssinn des nativen Proteins unverändert. Wir haben uns überzeugt, daß die Silbersalzverbindungen mit Glutin und Albumin in gleicher Weise anodisch wandern wie die reinen Proteine.

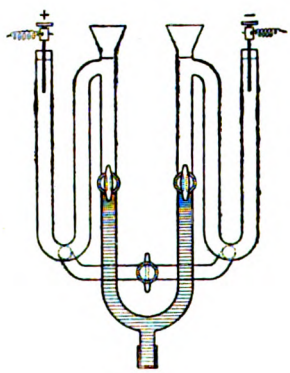


Fig. 6.

Unsere Versuche wurden mit dem von Landsteiner und Pauli seiner Zeit angegebenen Überführungsapparate[1]) ausgeführt, dessen Gebrauch näher bei Pauli und Flecker beschrieben ist. Eine Abbildung desselben bringt Fig. 6. Zur Überschichtung der Kolloidlösung diente Silbernitrat von der gleichen Konzentration, wie sie im mittleren U-Rohr neben dem Protein vorhanden war. Als Elektroden dienten kurze Feinsilberdrähte. Die Potentialdifferenz an der Kolloidlösung betrug 55 Volt. Zum Proteinnachweise bewährte sich so-

[1]) Mit passendem Stativ zu beziehen durch Fritz Köhler, Leipzig.

wohl für Glutin als auch Albumin auch dieses Mal die Schichtung über Trichloressigsäure (vgl. Pauli und Flecker). Lösungen von 0,4% Albumin mit 0,001 n-$AgNO_3$, sowie von 0,25% Glutin mit 0,001 n-$AgNO_3$ ergaben stets nach einer halbstündigen Durchströmung starke Schichtprobe auf der anodischen, spurenweise auf der kathodischen Seite, niemals ein umgekehrtes Verhalten.

Bei dieser in allen wesentlichen Punkten festgestellten Übereinstimmung der allgemeinen Eigenschaften der Silbersalz- und Alkalisalzproteine, gleichgültig ob dieselben löslich sind oder nicht, und bei der quantitativen Deckung der elektrometrischen Messung des aufgenommenen anionischen und kationischen Salzanteiles durch das Eiweiß in beiden Fällen, scheint uns einer vollständig widerspruchslosen Vereinigung der Versuchsergebnisse nichts im Wege zu stehen.

Wir dürfen nunmehr folgern, daß bei den Neutralsalzeiweißverbindungen der Alkali-, Erdalkali- und Silbersalze der anionische und kationische Teil des Salzes in äquivalenter Menge vom Protein aufgenommen wird.

Wie dies schon bei Oryng und Pauli ausgeführt wurde, zeigt der Wert der maximal gebundenen Grammäquivalente Alkalisalz an, daß auf ein Eiweißmolekül mehrere Salzmoleküle eintreten müssen, da man sonst zu einem unwahrscheinlich niedrigen Molekulargewicht des Proteins gelangt. Vollkommen die gleichen Betrachtungen gelten für die Aufnahme von Silbersalz durch die Eiweißkörper.

Eine gewisse Sonderstellung nimmt das Silbersalzalbumin durch den nahezu linearen Verlauf der Bindungskurve in der Kälte und durch seine Wasserunlöslichkeit ein, die allerdings bei Zimmertemperatur an das Überschreiten eines Bindungswertes von etwa $^2/_3$ der maximal aufgenommenen Silbermenge geknüpft erscheint. Nach unseren Ausführungen wäre also ein genuines Silbersalzprotein, erst nachdem es mehrere Salzmoleküle auf ein Eiweißmolekül gebunden hat, unlöslich. Die Höchstmenge des von Albumin aus Silbernitrat aufgenommenen Silbers würde sich aus unseren Versuchen auf rund 55 mg Ag für 1000 mg Albumin berechnen. Die gefundenen Unterschiede im Bindungsvermögen der verschiedenen Eiweißkörper für Silbersalze haben auch einiges toxikologische und pharmakologische Interesse.

Bei dem Dunkel, das gegenwärtig über der konstitutiven Grundlage der Hitzedenaturierung des Albumins schwebt, müssen

wir es uns derzeit versagen, an die beobachteten wechselseitigen Beziehungen zwischen Bindung von Silbersalz und Hitzekoagulation des Albumins weitergehende Bemerkungen zu knüpfen.

Die Untersuchungen am Casein sind wegen der Mitwirkung des suspensoiden Anteiles an der Reaktion vorerst zu einer quantitativen Vergleichung wenig geeignet, doch entbehrt die Feststellung gewiß nicht des biologischen Interesses, daß der im üblichen Sinne unlösliche Proteinanteil sich am Gleichgewichte mit dem Salze erheblich beteiligt.

Die Untersuchungen müssen nach verschiedenen Richtungen weitergeführt werden. Immer wieder offenbart sich auf diesem ebenso schwierigen als bedeutungsvollen Gebiet der hohe Wert der physikalisch-chemischen Behandlung.

Über die Verschiebung einzelner amylolytischer Kräfte der Malzamylase und deren Verhalten beim Aufbewahren in Gegenwart verschiedener Reagentien.

Von

T. Chrząszcz und A. Joscht.

(Aus dem Laboratorium der Brennereischule und der Versuchsstation für Gärungsgewerbe in Dublany.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1916.)

Mit 3 Figuren im Text.

Die bisherigen Resultate der Amylase-Untersuchungen stimmen im allgemeinen darin überein, daß das Wesen der Amylasewirkung eine zusammengesetzte Erscheinung ist[1]). Nach den neuesten dahin zielenden Untersuchungen wären in dem Begriff der Amylase vier Funktionen, evtl. vier getrennte, enzymatische Kräfte zu unterscheiden, die in verschiedener Weise ihre Wirkung auf die Stärke ausüben; es wären nämlich: eine stärkeverflüssigende, eine stärkedextrinierende, eine stärkeverzuckernde und endlich eine stärkeausfällende Kraft[2]).

Von diesen vier Funktionen treffen wir in der Literatur am häufigsten die stärkeverflüssigende und die stärkeverzuckernde Kraft berücksichtigt, da sie leicht einer qualitativen Unterscheidung zugänglich sind. Das war auch ein Grund zur Ansicht, die von C. Oppenheimer „Zweienzymtheorie" genannt wird, nach der die Amylase in ihrer Wirkung eigentlich aus den genannten zwei Kräften zusammengesetzt ist. Die dextrinierende Wirkung entging sozusagen einer Untersuchung als separate Funktion, weil sie als weitere Wirkung der verflüssigenden Kraft, oder als Vorstufe der verzuckernden Kraft

[1]) C. Oppenheimer, Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1913, 4. Aufl.

[2]) T. Chrząszcz und K. Terlikowski, Wochenschr. f. Brauerei 1912, Nr. 41 bis 44.

angesehen wurde[1]). Die letzte endlich: die stärkeausfällende Kraft ist verhältnismäßig schwach und entgeht dadurch am meisten der Beobachtung[2]).

Des weiteren bleibt also die Frage nach der zusammengesetzten Natur der Amylasewirkung offen. Bisherige Untersuchungen führten noch nicht dazu, aus einem Präparate oder einer Amylaselösung mit zusammengesetzter Funktion einzelne Präparate oder deren Lösungen zu erhalten, die nur mit einfachen amylolytischen Kräften ausgestattet würden. Von diesbezüglichen Bestrebungen können nur zwei Arbeiten genannt werden:

1. Die Arbeit von Fraenkel und Hamburg[3]), in der die Autoren nur zwei Kräfte der Amylase, nämlich die stärkeverflüssigende und die stärkeverzuckernde berücksichtigen und auf Grund eines angeblich reinen Präparates verschiedene Diffusionsmöglichkeit der genannten Kräfte bei der Dialyse zu zeigen bestrebt sind.

Wir müssen aber ins Auge fassen, daß die von den Autoren zur Gewinnung eines reinen Amylasepräparates gebrauchte Methode ganz ernste Zweifel hervorruft, wie wir sie in der Arbeit von Münter[4]) antreffen. Auch in unserem Laboratorium wurden keine günstigen Resultate erhalten bei den Versuchen, die Amylase auf diese Weise rein zu gewinnen. Diese Zweifel werden durch widersprechende Einzelheiten der Arbeiten von Reinitzer[5]) und Münter[6]) einerseits und Fraenkel und Hamburg andererseits bekräftigt. Der Wert der experimentellen Resultate der Autoren wird durch den Gebrauch nicht ganz ausreichend empfindlicher Methoden vermindert, und was die Bestimmung der verzuckernden Kraft anbelangt, war

---

[1]) Wijsmann, Rec. d. trav. chim. des Pays-Bas **9**, Nr. 1, 1890; Beyerinck, Zentr. f. Bakt. (II), 221, 1895. — Pottevin, Annales de l'Inst. Pasteur **13**, 665, 1899.

[2]) Fernbach und Wolff, Annales de l'Inst. Pasteur **18**, 165, 1904: Chrząszcz-Terlikowski, l. c.

[3]) Fraenkel und Hamburg, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **8**, 389, 1906.

[4]) Münter, Landw. Jahrb. 39. Erg.-Bd. **3**, 298.

[5]) Reinitzer, Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 352, 1909.

[6]) l. c.

die benützte Methode (nach Effront) sogar ungenau[1]). Endlich ist das Sinken der verzuckernden Kraft in der dialysierten Flüssigkeit noch nicht ein Beweis für das Übergehen derselben in das Dialysat, wie es aus den Arbeiten von Lisbonne und vor allem aus denen von Lisbonne und Vulquin[2]), ferner von Bierry, Giaja und Henri[3]), Bierry-Giaja[4]) und endlich Guyenot[5]) hervorgeht.

Aber der größte Einwand, der gegen diese Arbeit von Fraenkel und Hamburg gerichtet werden muß, ist der fast gänzliche Mangel an experimentellen Zahlen, was eine Nachprüfung ihrer Angaben unmöglich macht. Indem wir uns erlauben, das Augenmerk auf diese Mängel zu richten, können wir nicht umhin, unsere Verwunderung darüber auszusprechen, daß diese Arbeit in ein so wichtiges Werk wie Oppenheimers Fermente Eintritt erlangt hat und dort eine Beachtung fand[6]), die unserer Meinung nach infolge Mangel an Daten ihr nicht zukommt.

2. Die Arbeit von Chrząszcz und Terlikowski[7]), in der verschiedene Funktionen der Amylase aus ungekeimtem Getreide zur Prüfung gelangen.

Endlich muß auch hervorgehoben werden, daß schon bei Gelegenheit vergleichender Amylasestudien auf Grund verschiedener Getreidearten einer von uns auf ungleichmäßige Verhältnisse zwischen den Kräften gestoßen ist, die verflüssigend, verzuckernd oder dextrinierend auf die Stärke einwirken[8]).

Trotz dieser Arbeiten, die anscheinend schon in ausreichendem Maße die Mannigfaltigkeit der Funktionen der Amylase, resp. die Ungleichartigkeit der Zusammensetzung ihrer Wirkung betonen, begegnen wir in der wissenschaftlichen Literatur Arbeiten, die ganz entgegengesetzte Resultate im Hinblick auf das Einwirken verschiedener physischer sowie chemischer

---

[1]) Chrząszcz und Pierożek: Z. f. Spir.-Ind. **1910**, Nr. 7 bis 14.
[2]) Lisbonne-Vulquin, Ann. d. Brass. et d. distill. **15**, 274, 1912.
[3]) Bierry-Giaja-Henri, Soc. biol. **60**, 479.
[4]) Bierry und Giaja, Soc. biol. **62**, 432, 1907.
[5]) Guyenot, Soc. biol. **63**, 439, 1908.
[6]) C. Oppenheimer, l. c. **1**, 279.
[7]) l. c. **2**, S. 1.
[8]) T. Chrząszcz, Wochenschr. f. Brauerei **1913**, Nr. 41—42.

Agentien auf die Amylasewirkung angeben. Diese Widersprüche werden dadurch bedingt, daß zur Bestimmung der Amylasewirkung Methoden angewandt werden, die entweder nur einzelnen ihrer Funktionen entsprechen, oder solche, die zwar die Summe einzelner dieser Wirkungen umfassen, aber gleichzeitig diese Zusammensetzung nicht berücksichtigen, oder nicht anerkennen. Als Grundlage dieser Methoden dienen Änderungen der Viscosität des Stärkekleisters unter der enzymatischen Einwirkung, des polarimetrischen Drehungswinkels der entstehenden Reaktionsprodukte, der optischen Dichte einzelner Reaktionsflüssigkeiten, der Reduktion der Fehlingschen Lösung und der Jodreaktion.

Wie gesagt, wurden auch in unserem Laboratorium einige Beobachtungen über das ungleichartige Spiel verschiedener Amylasewirkungen gemacht. Diese dienten uns samt den schon oben zitierten Einzelheiten als Unterlage für vorliegende Untersuchungen. Die führten wir in der Richtung zweier Fragen:

1. Ob man imstande ist, mittels verschiedener Reagentien einzelne Amylasewirkungen voneinander zu trennen, indem man nur eine Funktion ohne die anderen erhält; eventuell ob man dieselben auf diese Weise zu einer solchen Verschiebung gegeneinander bringen kann, daß man mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Mannigfaltigkeit dieser Wirkungen schließen darf.

2. Welches ist das Verhalten der Amylase, eventuell ihrer einzelnen Funktionen während des Aufbewahrens in verschiedenen Reagentien?

Die Untersuchungsmethode.

Als Ausgangsmaterial wurde von uns ein Gerstenmalz benützt, das in unserer Versuchsbrennerei 20 Tage geführt, nachher in einer Temperatur unterhalb 35° getrocknet und vollständig gemahlen wurde. Aus diesem Malze wurden gewöhnlich 5%ige Auszüge auf folgende Weise gewonnen: 10 g Malz wurde mit 200 ccm der entsprechenden Flüssigkeit in einem Mischkolben übergossen und nachher in einem Schüttelapparate eine halbe Stunde geschüttelt; die Schüttelvorrichtung machte ca. 60 Drehungen in einer Minute. Dann wurde die ganze Flüssigkeit durch ein Papierfilter filtriert und nach der Entfernung der ersten Portion des Filtrates das klare Filtrat auf

seine enzymatische Kraft untersucht. Diese Untersuchung wurde gewöhnlich einige Male wiederholt: gleich nach der Filtration, nach 2 bis 4 Tagen und in interessanteren Fällen nach viel längerer, selbst monate- und sogar jahrelanger Frist. Teilweise arbeiteten wir auch mit $8^0/_0$igen Auszügen, denn durch die Kriegsereignisse wurden wir in unserer Arbeit gestört; nachdem wir aber nach $1^1/_2$ jahrelanger Unterbrechung zu derselben wieder zurückkehren konnten, fanden wir, daß das übrigens gut aufbewahrte Malz in seiner Wirkung etwas geschwächt worden war. Wir hielten es also für vorteilhaft, wie gesagt, $8^0/_0$ige Auszüge zu benützen, um ihre diastatische Kraft mit den vorigen auszugleichen. Ihre Gewinnung wurde auf die schon beschriebene Weise durchgeführt, nur wurden immer 16 g Malz anstatt 10 ausgezogen.

In der Untersuchung der in dieser Weise gewonnenen Auszüge wurden von uns drei amylolytische Kräfte berücksichtigt, nämlich die verflüssigende, verzuckernde und dextrinierende Kraft.

1. Die stärkeverflüssigende Kraft wurde nach der in unserem Laboratorium modifizierten[1]) Methode von Lintner-Sollied bestimmt. Die Reproduzierbarkeit der so gewonnenen Zahlen hängt vor allem von der Größe der verflüssigenden Kraft des Auszuges ab, und zwar: bei kleiner Kraft, also bei notwendigem Gebrauch größerer Dosen des Malzauszuges und des zu untersuchenden Reagens waren die Grenzen der erhaltenen Zahlen natürlich weiter, sie überschritten aber niemals $\pm$ 0,1 ccm des Malzauszuges. Dagegen bei stärker verflüssigenden Eigenschaft desselben, also bei Anwendung kleinerer Dosen, war die Reproduzierbarkeit der Bestimmungen besser, ihr Betrag war $\pm$ 0,05 ccm.

2. Die verzuckernde Kraft wurde auf folgende Weise bestimmt: 4 g lösliche Stärke des Institutes für Gärungsgewerbe in Berlin wurden heiß gelöst und nach dem Erkalten auf 100 ccm gebracht. Je 100 ccm dieser Stärkelösung wurden in einem 250-ccm-Kölbchen durch eine halbe Stunde in einem Thermostaten bei 50° mit einem Wattepfropf verstopft gelassen; diese Frist war zur Ausgleichung der Temperatur nötig. In dem

[1]) Chrząszcz-Pierożek, l. c.

von uns dazu benutzten Thermostaten nach Ostwald wurde die Temperatur 50° mittels eines Toluol-Regulators in den Grenzen $\pm$ 0,05° unterhalten. Der so erwärmte Stärkekleister wurde weiter aus einer Pipette mit 5 ccm des zu untersuchenden Auszuges versetzt und bei öfterem Rühren exakt durch eine halbe Stunde in dem Thermostaten gelassen. Dann wurde das Kölbchen schnell herausgenommen, die Flüssigkeit mit 5 Tropfen 30%iger Natronlauge zum Zwecke der Unterbrechung weiterer enzymatischer Einwirkung beschickt, auf 17,5° abgekühlt und mittels destillierten Wassers auf 500 ccm gebracht. Diese Flüssigkeit wurde dann filtriert, die erste Portion des Filtrates entfernt, und in dem klaren Filtrate wurde die Reduktion der Fehlingschen Lösung nach Bertrand bestimmt. Dazu wurden immer 20 ccm der Flüssigkeit verwendet und die Resultate in Kubikzentimeter einer titrierten Kaliumpermanganatlösung ausgedrückt, deren 1 ccm 0,009927 g Kupfer entsprach.

Bei jeder Bestimmung wurde weiter 0,3 ccm $KMnO_4$-Lösung (evtl. 0,56 ccm bei 8%igen Auszügen) abgezogen; solche Korrektion erhielten wir durch das Versetzen der Stärkelösung mit gekochtem Malzauszuge als Reduktion, die durch die Stärke selbst und durch den in dem Auszuge befindlichen Zucker hervorgerufen wurde. Ebenso wurden entsprechende Korrektionen eingeführt, wenn das untersuchte Reagens selbst eine Reduktion der Fehlingschen Lösung verursachte.

Die so gewonnenen Zahlen waren im schlimmsten Falle in den Grenzen $\pm$ 0,15 ccm $KMnO_4$ reproduzierbar.

3. Die Eigenschaft der Auszüge, Dextrine aus der Stärke zu bilden, wurde mit der unter 2. erhaltenen Flüssigkeit bestimmt. 10 ccm derselben wurden mit 2 ccm einer Jodlösung versetzt (2 g Jod und 4 g Kaliumjodid in 1 l destillierten Wassers) und die Farbe der Lösung untersucht. Dann wurden noch 10 ccm der Jodlösung zugesetzt, um die Reaktion mit einem Überschuß des Reagens kennen zu lernen. Die Jodreaktion drückten wir in folgender Farbenskala aus: blau, blau mit violetter Schattierung, blau-violett, violett, violett-rot, rot-braun, gelbrot, gelb.

In solchen Fällen, in denen wir eine direkte Einwirkung des untersuchten Reagens auf die Stärke oder auf die Fehlingsche Lösung vermuten konnten, wurden besondere Proben

in dieser Richtung vorgenommen, wie oben gesagt, mitgerechnet, und hie und da in die Zusammenstellung (siehe Tafel I) eingeführt.

Das Malz wurde von Zeit zu Zeit durch Untersuchung seiner Wasserauszüge kontrolliert. Während der ersten Monatsreihe unserer Untersuchungen fanden wir keine Veränderung seiner anfänglichen enzymatischen Kräfte. Den nach der Unterbrechung unserer Untersuchungen gefundenen Unterschied und seine Folgen haben wir schon oben (S. 4) besprochen.

Als Grundlage unserer, dem Wesen nach vergleichenden Untersuchungen wurde von uns der wäßrige 5- oder 8%ige Malzauszug benützt. Er war natürlich schwach sauer, und die Konzentration der Wasserstoffionen, mittels der Apparatur nach Michaelis[1]) elektrometrisch gemessen, betrug:

5,46 (p_H nach Sörensen) bei 5%igem Auszuge
5,35 („ „ „) „ 8% „ „

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Zahlen der Wasserstoffionenkonzentrationen waren wir imstande, mit obiger Apparatur mit der Reproduzierbarkeit $\pm$ 0,045 p_H zu bestimmen.

Die stärkeverflüssigende Kraft betrug:

0,40 ccm Auszug auf 20%ige Stärke bei 5%igem Auszuge
0,55 „ „ „ 20% „ „ „ 5% „ „
nach 2,5 Jahren
0,4 ccm Auszug auf 20% „ „ „ 8% „ „
nach 2,5 Jahren.

Die Größe der verzuckernden Kraft war:

10,00 ccm $KMnO_4$ bei 5%igem Auszuge
8,26 „ „ „ 5% „ „ nach 2,5 Jahren
10,25 „ „ „ 8% „ „ „ 2,5 „

Die Jodreaktion war:

gelb [rot (Jodüberschuß)] bei 5%igem Auszuge
rot [„ „] „ 5% „ „ nach 2,5 Jahren
gelb [„ „] „ 8% „ „ „ 2,5 „

Den obigen wäßrigen Auszug mit seiner Proportion der amylolytischen Kräfte betrachteten wir als Grundlage unserer

[1]) L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin, Springer, 1914, Abb. 25, S. 131.

weiteren Untersuchungen; wir untersuchten nämlich die Auszüge, die mit wäßrigen Lösungen verschiedener chemischer Körper zusammengestellt wurden, mit denen wir eine Veränderung des gegenseitigen Verhältnisses der enzymatischen Kräfte hervorzurufen hofften. Diese Reagentien waren meistenteils organische, übrigens von neutralen, sauren oder auch basischen Eigenschaften.

Die erhaltenen Resultate wurden in der Tafel I (A, B und C) tabellarisch zusammengestellt (s. S. 220—231):

Besprechung der Resultate.

Aus der obigen Zusammenstellung der Resultate unserer Untersuchungen ersieht man folgendes:

1. Wir vermochten die stärkeverflüssigende Kraft von den anderen zu besprechenden amylolytischen Wirkungen zu verschieben, wie die nächstfolgende Zusammenstellung zeigt (Tafel 2, Fig. 1):

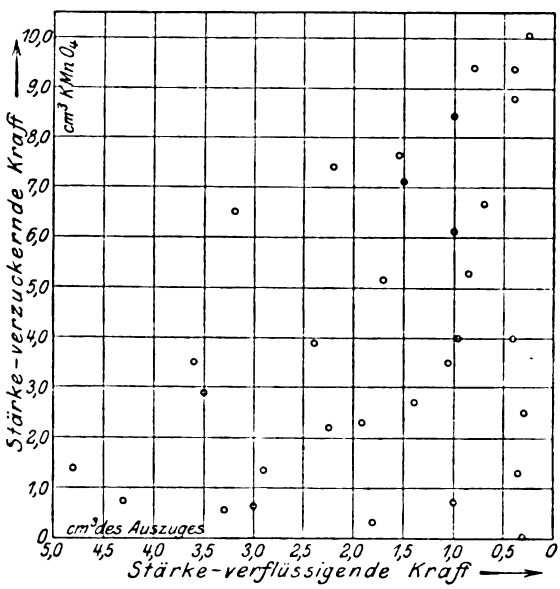


Fig. 1.

Man ersieht also leicht aus Tafel 2 und obiger Figur, wie jedem Vermögen zur Verflüssigung der Stärke immer eine ganze

Reihe von verschiedenen Verzuckerungskräften entspricht. Es ergibt sich daraus die Folgerung, daß man nötigerweise die stärkeverflüssigende Kraft der Malzamylase für eine besondere Funktion oder ein Enzym halten muß.

Tafel 2.

Verflüssigende Kraft	Verzuckernde Kraft		Nr. des Experimentes in der Tafel 1 für das	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
0,25—0,45	10,05	1,30	32	208
0,45—0,75	9,70	0,75	143	214
0,75—1,05	9,40	0,75	8	224
1,05—1,55	8,90	0,20	2	215
1,55—2,05	7,65	0,35	50	220
2,05—3,05	7,40	0,65	205	166
3,05—4,80	6,50	0,55	120	167

2. Wie schon aus obiger Zusammenstellung hervorgeht, haben wir die stärkeverzuckernde Kraft in unseren Untersuchungen ganz bedeutend von den zwei anderen abgelenkt. Als Beweis dafür möge die Tafel 3 dienen (siehe auch die Fig. 1), die ähnlich wie Tafel 2 nur mit Hinsicht auf die verzuckernde Kraft konstruiert wurde.

Tafel 3.

Verzuckernde Kraft	Verflüssigende Kraft		Nr. des Experimentes in der Tafel 1 für das	
ccm $KMnO_4$	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
0— 1	0,65	0	217	201
1— 2	0,35	4,8	208	118
2— 3	0,3	3,5	211	107
3— 4	0,4	3,6	86	136
4— 5	0,4	1,3	85	152
5— 6	0,8	1,7	151	135
6— 7	0,6	3,20	60	120
7— 8	0,3	2,4	206	13
8— 9	0,25	1,1	241	2
9—10,05	0,25	0,91	32	1

Daraus muß man dasselbe folgern, was wir für die stärkeverflüssigende Kraft bewiesen haben, daß nämlich die verzuckernde Kraft eine besondere Amylasefunktion, eventuell ein besonderes Enzym bildet.

Tafel

1	2	3	4	5	6
Nr.	Prozentzahl des Auszuges	Lösungsmittel	p_H	Untersucht nach	Veränderung beim Aufbewahren
1	5	10% CH_3OH	—	gleich	
2	5	10% „	—	2 Tagen	
3	5	30% „	—	gleich	
4	5	30% „	—	2 Tagen	
5	5	40% „	—	gleich	
6	5	40% „	—	2 Tagen	Niederschlag, abfiltriert.
7	5	10% C_2H_5OH	—	gleich	
8	5	10% „	—	2 Tagen	
9	5	10% „	—	6 „	
10	5	20% „	—	gleich	
11	5	20% „	—	2 Tagen	
12	5	30% „	—	gleich	
13	5	30% „	—	2 Tagen	
14	5	40% „	—	gleich	
15	5	40% „	—	2 Tagen	desgl.
16	5	50% „	—	gleich	
17	5	10% n-C_3H_7OH	—	„	
18	5	10% „	—	2 Tagen	
19	5	30% „	—	gleich	
20	5	30% „	—	3 Tagen	
21	5	30% „	—	5 „	desgl.
22	5	10% Glycerin	—	gleich	
23	5	10% „	—	13 Tagen	
24	5	20% „	—	gleich	
25	5	20% „	—	13 Tagen	
26	5	30% „	—	gleich	
27	5	30% „	—	37 Tagen	Wilde Hefe, abfiltriert.
28	5	30% „	—	ca. 2,5 Jahren	Kahmhefe, abfiltriert.
29	5	40% „	—	gleich	
30	5	40% „	—	62 Tagen	
31	5	40% „	—	ca. 2,5 Jahren	Niederschlag u. Penicillium, abfiltriert.
32	5	50% „	—	gleich	
33	5	50% „	—	4 Tagen	
34	5	50% „	—	62 „	
35	5	50% „	—	ca. 2,5 Jahren	klar
36	5	60% „	—	gleich	
37	5	60% „	—	ca. 2,5 Jahren	desgl.
38	5	70% „	—	gleich	
39	5	70% „	—	8 Tagen	
40	5	70% „	—	ca. 2,5 Jahren	desgl.
41	5	80% „	—	gleich	
42	5	80% „	—	12 Tagen	
43	5	90% „	—	gleich	
44	5	90% „	—	12 Tagen	
45	5	98,5% „	—	gleich	
46	5	10% Aceton	—	„	
47	5	10% „	—	2 Tagen	

7	8	9	10	11	12	13
Der Auszug wirkt						
stärke-verflüssigend bei		ver-zuckernd	dextrinierend		Das Lösungsmittel selbst hat	
% Stärke	Anzahl ccm des Auszuges	ccm $KMnO_4$	Jodreaktion bei 10 ccm der Flüssigkeit und 2 ccm Jod	10 ccm Jod	verflüssigende Kraft	verzuckernde Kraft
I A.						
20	0,90	9,10	gelb-rot	rot		
20	1,10	8,90	„	„		
10	*1,30*	7,70	blau-violett	rot-braun		
10	*1,40*	7,30	„	„		
6	*0,60*	4,55	blau	blau m. v. S.		
6	*0,70*	4,45	„	„		
20	0,60	9,55	gelb	gelb-rot		
20	0,80	9,40	rot	rot		
20	1,00	8,90	„	rot-braun		
20	0,70	9,05	„	rot		
20	0,90	8,75	violett	rot-braun		
20	2,00	7,55	blau m. v. S.	violett		
20	2,40	7,20	„	„		
10	*0,80*	5,90	blau	blau m. v. S.		
10	*0,90*	5,50	„	„		
6	*0,30*	3,95	„	blau		
20	0,40	9,70	rot	gelb-rot		
20	0,40	9,40	„	rot		
20	0,60	8,75	„	„		
20	0,65	8,55	violett-rot	„		
20	0,70	7,90	„	rot-braun		
20	0,30	9,90	gelb	gelb	6% Stärke Ø	
20	0,45	9,55	„	gelb-rot		
20	0,30	9,90	„	gelb		
20	0,30	9,95	„	„		
20	0,30	10,00	„	„		
20	0,30	9,56	„	gelb-rot		
6	*0,30*	4,26	blau	blau m. v. S.		
20	0,30	9,95	gelb	gelb	6% Stärke Ø	
20	0,30	9,70	„	gelb-rot		
6	*0,00*	0,30	blau	blau		
20	0,25	10,05	gelb	gelb		
20	0,25	9,95	„	„		
20	0,30	9,55	„	gelb-rot		
20	0,70	7,26	rot-braun	rot		
20	0,25	9,85	gelb	gelb	6% Stärke Ø	
20	1,00	6,12	violett-rot	rot-braun		
20	0,25	9,90	gelb	gelb	6% Stärke Ø	
20	0,25	9,70	„	„		
20	0,70	6,67	rot-braun	rot		
20	0,35	9,51	gelb	gelb-rot		
20	0,35	9,30	„	„		
20	0,35	9,46	„	„		
20	0,35	9,20	„	„		
10	*0,40*	0,35	blau	blau m. v. S.		
20	0,35	9,70	gelb	gelb		
20	0,40	9,45	„	gelb-rot		

1	2	3	4	5	6
Nr.	Prozentzahl des Auszuges	Lösungsmittel	p_H	Untersucht nach	Veränderung beim Aufbewahren
48	5	20% Aceton	—	gleich	
49	5	20% „	—	2 Tagen	
50	5	30% „	—	gleich	
51	5	30% „	—	2 Tagen	
52	5	40% „	—	gleich	
53	5	40% „	—	2 Tagen	
54	8	0,1% Formalin	—	gleich	
55	8	0,1% „	—	1 Tage	
56	8	0,1% „	—	10 Tagen	
57	8	0,2% „	—	gleich	
58	8	0,2% „	—	1 Tage	
59	8	0,5% „	—	gleich	
60	8	0,5% „	—	1 Tage	
61	8	0,5% „	—	9 Tagen	
62	8	1% „	—	gleich	
63	8	1% „	—	3 Tagen	
64	8	2% „	—	gleich	
65	8	2% „	—	3 Tagen	
66	8	5% „	—	gleich	
67	8	5% „	—	3 Tagen	
68	8	10% „	—	gleich	
69	8	13% „	—	„	
70	8	20% „	—	„	
71	5	0,25% Asparagin	—	„	
72	5	0,25% „	—	5 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
73	5	1% „	—	gleich	
74	5	1% „	—	3 Tagen	Bakterien, abfiltriert
75	5	3% „	—	gleich	
76	5	3% „	—	3 Tagen	Bakterien u. Krystallisat, abfiltriert
77	5	4% „	—	gleich	
78	5	4% „	—	3 Tagen	desgl.
79	5	5% „	—	gleich	
80	5	5% „	—	3 Tagen	desgl.
81	5	Reines Wasser	—	gleich	
82	5	„ „	—	12 Tagen	verdorben, abfiltriert
83	5	Wasser, mit n-Hexan gesättigt	—	gleich	
84	5	„ „ „ „	—	2 Tagen	
85	5	Wasser, m. Chloroform gesätt. (0,71:100)	—	gleich	
86	5	„ „ „ „	—	2 Tagen	
87	5	„ „ „ „	—	22 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
88	5	Wasser, mit CCl_4 gesättigt	—	gleich	
89	5	„ „ „ „	—	2 Tagen	
90	5	Wasser, m. Äthylacetat gesätt. (7,9:100)	—	gleich	
91	5	Wasser, mit Benzol gesätt. (0,072:100)	—	„	
92	5	„ „ „ „	—	2 Tagen	verdorben, abfiltriert
93	5	Wasser, mit Toluol gesättigt	—	gleich	
94	5	„ „ „ „	—	2 Tagen	filtriert
95	5	Wasser, mit Nitrobenzol gesättigt	—	gleich	

7	8	9	10	11	12	13
Der Auszug wirkt						
stärke-verflüssigend bei		verzuckernd	dextrinierend		Das Lösungsmittel selbst hat	
% Stärke	Anzahl ccm des Auszuges	ccm $KMnO_4$	Jodreaktion bei 10 ccm der Flüssigkeit und 2 ccm Jod	10 ccm Jod	verflüssigende Kraft	verzuckernde Kraft
20	0,50	9,30	gelb-rot	rot		
20	0,60	9,35	„	„		
20	1,55	7,65	violett	violett-rot		
20	1,60	7,55	blau m. v. S.	„		
10 / *6*	*2,50* / *0,50*	2,30	blau	blau m. v. S.		
10	*2,50*	*2,10*	„	„		
20	0,40	9,75	gelb	gelb		0,4 ccm $KMnO_4$
20	0,45	9,45	„	gelb-rot		
20	0,60	7,95	gelb-rot	rot		
20	0,40	9,20	gelb	gelb-rot		0,66 ccm $KMnO_4$
20	0,50	8,35	gelb-rot	rot		
20	0,50	8,60	„	„		0,86 ccm $KMnO_4$
20	0,60	6,55	rot	rot-braun		
20	1,50	2,10	blau	violett		
20	0,70	8,54	rot	rot		1,26 ccm $KMnO_4$
20	1,60	2,15	blau	violett		
20	1,10	6,75	rot-braun	rot-braun	Die Stärke wird steif und wird bei 100° aus d. Probiergläsern ausgeschleudert	2,11 ccm $KMnO_4$
6	*0,40*	0,75	blau	blau		
6	*0,40*	2,90	„	blau m. v. S.		4,56 ccm $KMnO_4$
6	*0*	0,30	„	blau		
6	*0*	0	„	„		8,05 ccm $KMnO_4$
6	*0*	0	„	„		10,15 ccm $KMnO_4$
6	*0*	0	„	„		14,40 ccm $KMnO_4$
20	0,40	9,35	gelb	gelb-rot		
20	0,50	9,25	„	„		
20	0,40	9,45	„	„		
20	0,45	9,45	„	„		
20	0,40	9,40	„	„		
20	0,50	9,45	„	„		
20	0,40	9,40	„	„		
20	0,55	9,30	„	„		
20	0,40	9,35	„	„		
20	0,55	9,15	„	„		
20	0,35	9,95	„	gelb		
20	0,60	7,95	gelb-rot	rot		
20	0,25	9,50	gelb	gelb-rot		
20	0,40	9,30	„	„		
20	0,40	4,10	rot	rot		0,65 ccm $KMnO_4$
20	0,40	4,00	„	„		
20	1,20	1,80	blau	violett		
20	0,30	9,70	gelb	gelb		
20	0,40	9,65	„	„		
20	0,40	9,60	„	gelb-rot		
20	0,40	9,15	„	„		
20	0,50	8,45	„	„		
20	0,40	9,15	„	„		
20	0,50	9,00	„	„		
20	0,40	8,80	„	„		

1	2	3	4	5	6
Nr.	Prozentzahl des Auszuges	Lösungsmittel	p_H	Untersucht nach	Veränderung beim Aufbewahren
96	5	Wasser, mit Nitrobenzol gesättigt . .	—	2 Tagen	abfiltriert
97	5	Wasser, m. Thymol gesätt. (0,083 : 100)	—	gleich	
98	5	„ „ „ „	—	4 Tagen	desgl.
99	5	0,05% Kupfersulfat	—	gleich	
100	5	0,05% „	—	2 Tagen	
101	8	Reines Wasser	—	gleich	
102	8	0,1% Zinksulfat	—	„	
103	8	0,1% „	—	2 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
104	8	10% Ammoniumsulfat	—	gleich	
105	8	20% „	—	„	
					Tafel
106	5	0,025% HCl	—	gleich	
107	5	0,025% „	—	3 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
108	5	0,01% H_2SO_4	—	gleich	
109	5	0,01% „	—	5 Tagen	desgl.
110	5	0,025% „	3,89	gleich	
111	5	0,025% „	3,88	4 Tagen	desgl.
112	5	0,05% „	3,60	gleich	
113	5	0,05% „	—	2 Tagen	
114	8	0,025% HNO_3	—	gleich	
115	8	0,05% „	4,31	„	
116	8	0,1% „	—	„	
117	5	0,01% H_3PO_4	—	„	
118	5	0,01% „	—	5 Tagen	desgl.
119	5	0,025% „	—	gleich	
120	5	0,025% „	—	4 Tagen	desgl.
121	5	0,05% „	—	gleich	
122	5	0,05% „	—	2 Tagen	desgl.
123	5	0,025% Ameisensäure	—	gleich	
124	5	0,025% „	—	3 Tagen	desgl.
125	5	0,05% „	—	gleich	
126	5	0,05% „	—	3 Tagen	desgl.
127	5	0,025% Essigsäure	—	gleich	
128	5	0,025% „	—	4 Tagen	desgl.
129	5	0,05% „	4,57	gleich	
130	5	0,05% „	—	4 Tagen	desgl.
131	5	0,1% „	—	gleich	
132	5	0,1% „	—	4 Tagen	desgl.
133	5	0,2% „	4,05	gleich	
134	5	0,2% „	4,06	4 Tagen	
135	5	0,05% Oxalsäure	4,74	gleich	
136	5	0,05% „	—	3 Tagen	desgl.
137	5	0,01% Bernsteinsäure	—	gleich	
138	5	0,01% „	—	3 Tagen	Bakterien, abfiltriert
139	5	0,025% „	4,42	gleich	
140	5	0,025% „	—	3 Tagen	desgl.
141	5	0,05% „	—	gleich	

7	8	9	10	11	12	13
Der Auszug wirkt						
stärke-verflüssigend bei		ver-zuckernd	dextrinierend		Das Lösungsmittel selbst hat	
% Stärke	Anzahl ccm des Auszuges	ccm $KMnO_4$	Jodreaktion bei 10 ccm der Flüssigkeit und 2 ccm Jod	10 ccm Jod	verflüssigende Kraft	verzuckernde Kraft
20	0,40	8,95	gelb	gelb-rot		
20	0,45	7,70	blau	blau m. v. S.		
20	0,60	7,25	„	„		
20	1,70	1,35	„	violett-rot		
20	1,90	1,15	„	violett		
20	0,40	—	gelb	gelb		
20	0,40	9,45	„	„		
20	0,40	8,81	„	gelb-rot		
20	0,30	9,55	„	gelb		
20	1,00	8,45	rot	rot		
I B.						
20	1,10	4,60	blau	violett-rot	keine	keine
20	3,50	2,90	„	blau-violett		
20	0,60	8,70	rot-braun	rot		
20	3,80	1,25	blau	blau m. v. S.		
20	0,65	7,70	rot	rot		
20	3,00	1,90	blau	blau m. v. S.		
20	3,90	1,00	„	blau-violett		0,00 ccm $KMnO_4$
10	*0,70*	0,65	„	blau m. v. S.		
20	0,40	9,56	gelb	gelb		
20	0,60	7,76	violett-rot	rot		
20	4,30	0,76	blau	violett		
20	0,50	9,25	gelb	gelb-rot		
20	4,80	1,40	blau	blau m. v. S.		
20	0,55	8,60	rot-braun	gelb-rot		
20	3,20	6,50	violett	rot-braun		
20	1,00	5,50	„	„		
20	1,20	5,25	blau-violett	violett-rot		
20	0,60	8,40	rot	rot		
20	0,70	7,95	violett-rot	„		
20	1,40	2,70	blau	violett		
20	1,90	2,30	„	„		
20	0,55	9,15	gelb	gelb-rot		
20	0,55	8,90	„	„		
20	0,60	8,20	rot	rot	6% Stärke Ø	
20	0,70	7,75	„	„		
20	0,75	6,55	violett	rot-braun		
20	0,85	5,90	„	„		
20	1,05	3,50	blau m. v. S.	violett-rot		
20	2,30	2,70	blau	blau-violett		
20	1,70	5,15	„	violett	20% Stärke Ø	
20	3,60	3,50	blau m. v. S.	blau-violett		
20	0,40	9,55	gelb	gelb		
20	0,50	9,50	„	„		
20	0,45	9,60	„	„		
20	0,55	9,35	„	gelb-rot		
20	0,50	9,35	„	„		

1	2	3	4	5	6
Nr.	Prozentzahl des Auszuges	Lösungsmittel	p_H	Untersucht nach	Veränderung beim Aufbewahren
142	5	0,05% Bernsteinsäure	—	3 Tagen	Bakterien, abfiltriert
143	5	0,05% „	—	gleich	
144	5	0,05% „	—	3 Tagen	desgl.
145	5	0,1% „	—	gleich	
146	5	0,1% „	—	3 Tagen	
147	5	0,1% „	—	gleich	
148	5	0,1% „	—	3 Tagen	desgl.
149	5	0,15% „	—	gleich	
150	5	0,15% „	—	3 Tagen	desgl.
151	5	0,15% „	—	gleich	
152	5	0,15% „	—	3 Tagen	desgl.
153	5	0,25% „	3,87	gleich	
154	5	0,25% „	3,79	4 Tagen	desgl.
155	5	3% „	—	gleich	
156	5	4% „	—	„	
157	5	5% „	—	„	
158	5	0,025% Milchsäure	—	„	
159	5	0,025% „	—	3 Tagen	
160	5	0,05% „	—	gleich	
161	5	0,05% „	—	3 Tagen	
162	5	0,1% „	—	gleich	
163	5	0,1% „	—	3 Tagen	desgl.
164	5	0,15% „	—	gleich	
165	5	0,15% „	—	3 Tagen	desgl.
166	5	0,25% „	—	gleich	
167	5	0,25% „	—	3 Tagen	desgl.
168	5	0,3% „	—	gleich	
169	5	0,3% „	—	3 Tagen	
170	5	0,35% „	—	gleich	
171	5	0,35% „	—	3 Tagen	
172	5	0,025% d-Weinsäure	—	gleich	
173	5	0,025% „	—	4 Tagen	Fermentation, abfiltriert
174	5	0,05% „	—	gleich	
175	5	0,05% „	—	4 Tagen	desgl.
176	5	0,1% „	—	gleich	
177	5	0,1% „	—	4 Tagen	desgl.
178	5	0,2% „	3,34	gleich	
179	5	0,2% „	3,35	4 Tagen	verdorben, abfiltriert
180	5	0,025% Citronensäure	—	gleich	
181	5	0,025% „	—	3 Tagen	Bakterien, abfiltriert
182	5	0,05% „	—	gleich	
183	5	0,05% „	—	3 Tagen	desgl.
184	5	0,1% „	—	gleich	

7	8	9	10	11	12	13
Der Auszug wirkt						
stärke-verflüssigend bei		ver-zuckernd	dextrinierend		Das Lösungsmittel selbst hat	
% Stärke	Anzahl ccm des Auszuges	ccm $KMnO_4$	Jodreaktion bei 10 ccm der Flüssigkeit und 2 ccm Jod	10 ccm Jod	verflüssigende Kraft	verzuckernde Kraft
20	0,55	9,15	gelb	gelb-rot		
20	0,50	9,70	„	gelb	20% Stärke Ø	
20	1,50	7,10	violett	rot-braun		
20	0,65	7,65	rot	rot		
20	0,70	7,40	violett-rot	„		
20	0,60	8,30	rot	„		
20	0,90	7,30	violett-rot	rot-braun		
20	0,85	5,25	violett	„		
20	0,90	5,25	„	„		
20	0,80	5,60	„	„		
20	1,30	4,55	blau m. v. S.	„		
20	1,30	2,95	blau	violett		
20	2,20	2,25	„	blau m. v. S.		
6	*0*	0	„	blau		
6	*0*	0	„	„		
6	*0*	0	„	„		
20	0,60	9,00	gelb	gelb-rot		
20	0,65	8,70	„	„		
20	0,55	9,20	„	„		
20	0,60	8,95	„	„		
20	1,10	4,00	blau	rot-braun		
20	1,30	3,75	„	violett-rot		
20	2,60	1,60	„	blau-violett		
20	3,20	1,25	„	blau m. v. S.		
20 / *10*	3,00 / *0,85*	0,65	„	blau-violett		
20 / *10*	3,30 / *1,45*	0,55	„	blau m. v. S.		
10	*1,90*	0,40	„	„		
6	*dick-flüssig*	0,30	„	„		
6		0,30	„	„		
6		0,35	„	„		
20	0,55	9,10	gelb	gelb-rot		
20	0,75	8,55	rot-braun	rot		
20	0,70	7,15	violett-rot	rot-braun		
20	1,00	6,50	„	„		
20 / *10*	2,90 / *0,40*	1,35	blau	blau-violett		
20 / *10*	3,70 / *0,50*	1,30	„	blau m. v. S.		
10 / *6*	*2,00* / *0,30*	0,35	„	„	6% Stärke Ø	
6	*0,70*	0,50	„	„		
20	0,50	9,50	gelb	gelb-rot		
20	0,60	9,45	„	„		
20	0,55	9,10	„	„	20% Stärke Ø	
20	0,70	8,70	gelb-rot	rot		
20	1,15	4,15	blau	rot-braun		

1	2	3	4	5	6
Nr.	Prozentzahl des Auszuges	Lösungsmittel	p_H	Untersucht nach	Veränderung beim Aufbewahren
185	5	0,1% Citronensäure	—	3 Tagen	
186	5	0,1% „	—	gleich	
187	5	0,1% „	—	3 Tagen	Bakterien, abfiltriert
188	8	0,5% Trikresol	—	gleich	
189	8	0,5% „	—	6 Tagen	
190	5	0,025% Salicylsäure	—	gleich	
191	5	0,025% „	—	5 Tagen	Schimmel, Niederschlag, abfiltriert
192	5	0,025% „	—	9 „	
193	5	0,1% „	—	gleich	
194	5	0,1% „	—	5 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
195	5	0,1% „	—	9 „	
196	5	0,225% „ (gesättigt)	—	gleich	
197	5	0,225% „ „	—	3 Tagen	
198	5	0,025% Tannin	—	gleich	
199	5	0,025% „	—	3 Tagen	desgl.
200	5	0,05% „	—	gleich	
201	5	0,05% „	—	4 Tagen	desgl.
					Tafel
202	5	0,01% NaOH	—	gleich	
203	5	0,01% „	—	5 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
204	5	0,025% „	—	gleich	
205	5	0,025% „	—	4 Tagen	desgl.
206	5	0,05% „	—	gleich	
207	5	0,05% „	—	3 Tagen	desgl.
208	5	0,1% „	9,45	gleich	
209	5	0,1% „	—	2 Tagen	
210	8	0,05% NH_3	—	gleich	
211	8	0,1% „	—	„	
212	8	0,1% „	—	3 Tagen	
213	8	0,25% „	—	gleich	
214	8	0,25% „	—	3 Tagen	
215	8	0,25% „	—	11 „	
216	8	0,25% „	—	17 „	
217	8	0,5% „	—	gleich	
218	8	0,5% „	—	9 Tagen	
219	8	1,0% „	—	gleich	
220	8	1,0% „	—	3 Tagen	
221	8	0,1% Na_2CO_3	—	gleich	
222	8	0,1% „	—	1 Tage	
223	8	0,25% „	—	gleich	
224	8	0,75% „	—	„	
225	8	1,0% „	—	„	
226	5	0,25% Harnstoff	—	„	
227	5	0,25% „	—	3 Tagen	verdorben, abfiltriert
228	5	1,0% „	—	gleich	
229	5	1,0% „	—	3 Tagen	desgl.

7	8	9	10	11	12	13
Der Auszug wirkt						
stärke-verflüssigend bei		ver-zuckernd	dextrinierend		Das Lösungsmittel selbst hat	
% Stärke	Anzahl ccm des Auszuges	ccm $KMnO_4$	Jodreaktion bei 10 ccm der Flüssigkeit und 2 ccm Jod	10 ccm Jod	verflüssigende Kraft	verzuckernde Kraft
20	1,30	3,75	blau	rot-braun		
20	1,10	4,55	blau m. v. S.	„		
20	1,50	3,85	blau	blau-violett		
20	0,35	9,56	gelb	gelb		
20	0,60	7,45	rot	rot		
20	0,50	9,05	gelb	gelb-rot		
20	0,75	8,25	rot	rot		
20	2,40	3,90	blau	blau m. v. S.		
20	0,95	4,00	„	blau-violett		
20	1,20	3,20	„	„		
20	1,60	2,95	„	„		
20	3,20	0,55	„	blau m. v. S.		
6	*0,05*					
6	*0,10*	0,50	„	blau		
20	1,10	7,20	violett-rot	rot-braun		
20	1,25	6,65	blau m. v. S.	violett-rot		
20	2,20	3,05	blau	blau-violett		
6	*0*	0,30	„	blau m. v. S.		
I C.						
20	0,30	9,25	gelb	gelb-rot		
20	3,30	2,70	blau	blau m. v. S.		
20	0,20	9,25	gelb	gelb-rot		
20	2,20	7,40	blau m. v. S.	rot		
20	0,30	7,95	rot-braun	gelb-rot		
20	0,40	7,90	„	„		
20	0,35	1,30	violett	rot-braun	6% Stärke Ø	0,00 ccm $KMnO_4$
20	0,50	1,30	blau-violett	violett-rot		
20	0,30	8,26	rot	rot		
20	0,30	2,50	violett	rot-braun		
20	0,30	2,25	„	„		
20	0,45	1,75	„	violett-rot		
20	0,60	0,75	blau m. v. S.	violett		
20	1,30	0,35	blau	„		
20	1,45	0,20	„	blau-violett		
20	0,65	1,00	blau-violett	violett-rot		
20	1,30	0,50	blau	violett		
20	1,40	0,65	„	„	6% Stärke Ø	
20	1,80	0,35	„	blau m. v. S.		
20	0,30	8,90	gelb	gelb-rot		
20	0,30	8,75	„	„		
20	0,30	8,65	rot	rot		
20	1,00	0,75	blau	violett	6% Stärke Ø	
6	*0,10*	0,80	„	blau m. v. S.		
20	0,40	9,50	gelb	gelb-rot		
20	0,60	9,10	„	„		
20	0,30	9,50	„	„		
20	0,50	9,25	„	„		

1	2	3	4	5	6
Nr.	Prozentzahl des Auszuges	Lösungsmittel	p_H	Untersucht nach	Veränderung beim Aufbewahren
230	5	3,0% Harnstoff	—	gleich	
231	5	3,0% „	—	3 Tagen	verdorben, abfiltriert
232	5	10% „	—	gleich	
233	5	10% „	—	2 Tagen	Krystallisat., abfiltriert
234	5	10% „	—	33 „	desgl.
235	5	Anilinwasser (3,1%)	—	gleich	
236	5	„	—	2 Tagen	Niederschlag, abfiltriert
237	5	„	—	4 Tagen	desgl.
238	5	1% Pyridin	—	gleich	
239	5	1% „	—	2 Tagen	
240	5	1% „	—	ca. 2,5 Jahren	Hefe, Bakterien, abfiltriert
241	5	3% „	—	gleich	
242	5	3% „	—	2 Tagen	
243	5	3% „	—	8 „	
244	5	3% „	—	ca. 2,5 Jahren	Niederschlag, abfiltriert
245	5	6% „	—	gleich	
246	5	6% „	—	2 Tagen	
247	5	6% „	—	ca. 2,5 Jahren	desgl.
248	8	Chinolinwasser	—	gleich	
249	8	„	—	2 Tagen	Opalescenz
250	8	„	—	10 „	desgl.
251	8	„	—	24 „	Niederschlag, abfiltriert
252	8	„	—	46 „	desgl.
253	8	„	—	66 „	Sauer, Bakterien, abfiltr.
254	5	Chininwasser (1:1670)	—	gleich	
255	5	„ (1:1670)	—	2 Tagen	Fermentation, abfiltriert

3. Die größten Schwierigkeiten zur Feststellung unserer Ansicht auf das Wesen der Sache bereitete uns die stärkedextrinierende Kraft, weil dieselbe auf Grund einer Farbenskala bestimmt wurde, deren Stufen verschiedenen Abbaustadien der Stärke entsprechen; es beziehen sich also dieselben immer auf komplizierte Gemische verschiedener Dextrine, unter denen manche hervorstechen. Eine Zusammenstellung entsprechender Zahlen aus der Tafel 1 soll dazu dienen, das Verhalten der dextrinierenden Kraft dem Verständnis näherzurücken (Tafel 4 und 5, Fig. 2 und 3).

Im allgemeinen gelangt man zu der Ansicht, daß die Jodreaktion, die für die Abbaustufe der Stärke charakteristisch ist, fester mit der verflüssigenden als mit der verzuckernden Kraft verknüpft ist. Es können aber auch Fälle vorkommen (z. B. Ex-

7	8	9	10	11	12	13
Der Auszug wirkt						
stärke-verflüssigend bei		ver-zuckernd	dextrinierend		Das Lösungsmittel selbst hat	
% Stärke	Anzahl ccm des Auszuges	ccm $KMnO_4$	Jodreaktion bei 10 ccm der Flüssigkeit und 2 ccm Jod	10 ccm Jod	verflüssigende Kraft	verzuckernde Kraft
20	0,30	9,50	gelb	gelb-rot		
20	0,35	9,55	„	„		
20	0,25	9,40	„	„		
20	0,30	8,60	„	„		
6	*0*	0,25	blau	blau		
20	0,30	7,20	gelb	gelb-rot	6% Stärke 0	
20	0,40	3,75	rot	rot		
20	0,40	3,05	„	„		
20	0,30	9,35	gelb	gelb		
20	0,30	9,30	„	gelb-rot		
6	*0,70*	4,35	blau	blau m. v. S.		
20	0,25	8,95	gelb	gelb-rot	20% Stärke 0	
20	0,25	8,95	„	„		
20	0,30	9,05	„	„		
20	1,40	2,53	blau-violett	violett		
20	0,30	8,40	gelb	gelb-rot		
20	0,30	7,15	„	„		
20	0,90	1,36	blau-violett	violett		
20	0,30	9,40	gelb	gelb		0,00 ccm $KMnO_4$
20	0,30	9,45	„	„		
20	0,35	9,40	„	„		
20	0,40	9,45	„	„		
20	0,45	9,45	„	gelb-rot		
20	0,70	8,40	„	gelb		
20	0,35	9,70	„	„		
20	0,35	9,70	„	„		

periment Nr. 105 oder 253), wo bei einer verhältnismäßig niedrigen verflüssigenden und hohen verzuckernden Kraft eine hohe, d. h. weit vorgeschrittene Jodreaktion angetroffen wird. Dadurch wird wieder mehr eine Verschiebung und Verknüpfung mit der verzuckernden Kraft angezeigt. Diese Mannigfaltigkeit der Verschiebung der Jodreaktion in der Richtung beider anderen Amylasewirkungen weist darauf hin, daß die ihr entsprechende Funktion entweder eine Resultierende beider Kräfte ist, wofür aber eigentlich eine größere Regelmäßigkeit der Resultate sprechen müßte, oder aber, daß sie auch wie die zwei schon besprochenen Wirkungen eine selbständige Funktion bildet, die durch das Bestehen eines besonderen Enzyms hervorgerufen wird. Auf Grund des schon Gesagten neigen wir auch zu der letzten Ansicht.

Tafel 4.

Jodreaktion	Verflüssigende Kraft		Nr. des Experimentes aus der Tafel 1 für das	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
Blau	0,45	4,8	97	118
Blau m. viol. Schatten	0,60	2,4	214	13
Blau-violett	0,5	1,4	209	244
Violett	0,3	3,20	212	120
Violett-rot	0,6	1,1	115	198
Rot-braun	0,3	1,1	206	64
Rot	0,3	1,0	210	9
Gelb	0,25	0,7	32	253

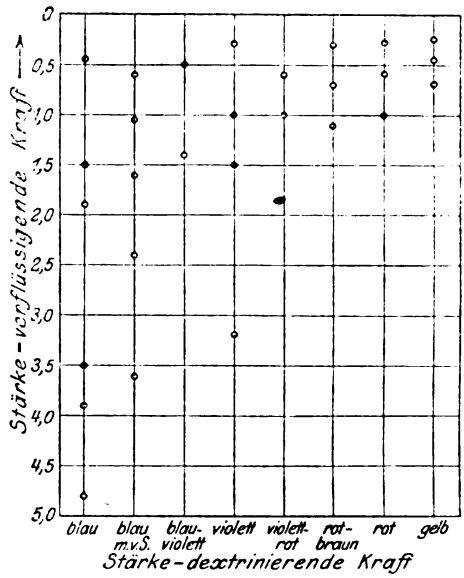


Fig. 2.

Tafel 5.

Jodreaktion	Verzuckernde Kraft		Nr. des Experimentes aus der Tafel 1 für das	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
Blau	7,70	0,20	97	216
Blau m. viol. Schatten	7,55	0,75	12	214
Blau-violett	7,70	1,00	3	217
Violett	8,75	1,30	11	208
Violett-rot	8,55	6,12	20	37
Rot-braun	8,70	6,67	108	40
Rot	9,70	3,05	17	237
Gelb	10,05	7,15	32	246

Wenn wir jetzt weiter das Verhalten der Amylase, resp. ihrer einzelnen Funktionen während des Aufbewahrens mit verschiedenen Reagentien ins Auge fassen, so können wir im allgemeinen unter diesen Reagentien zwei Klassen unterscheiden; zu der ersten gehören nämlich solche Verbindungen, die gut die Amylase aus dem Malze extrahieren, dieselbe weder bei dem Ausziehen noch beim Aufbewahren schädigen; gleichzeitig wirken sie als Antiseptica, lassen also nicht zu, daß die Auszüge und also die in denselben gegenwärtige Amylase verdorben wird.

Zu dieser Klasse zählen wir auch die Reagentien oder aber diese Konzentrationen mancher von ihnen, bei denen manche Amylasewirkungen erhalten bleiben, während andere geschädigt werden.

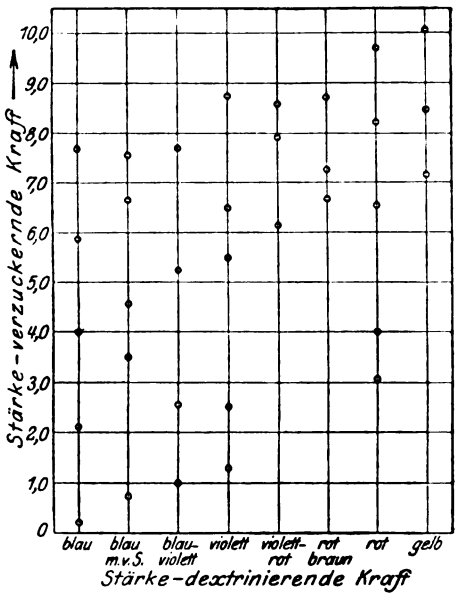


Fig. 3.

Die zweite Klasse umfaßt wieder die Reagentien, welche die Amylase in allen ihren Wirkungen beeinträchtigen, sowie auch andere, die, ohne etwaige antiseptische Eigenschaften zu haben oder nur mit sehr schwachen ausgerüstet, verschiedene, die Amylase schädigende Kleinwesen zur Entwicklung zulassen.

Der ersten dieser Klassen muß vor allem das Glycerin zugezählt werden. Dasselbe wurde schon von vielen Autoren als enzymatisches Lösungsmittel benützt, insbesondere als ein Lösungsmittel für Amylase; hier bildet das Glycerin in jeder Beziehung ein vorzügliches Lösungsmittel und zwar für alle Amylasefunktionen in den Grenzen der Glycerinkonzentration von 20 bis 90%. Unterhalb dieses Konzentrationsgebietes wird zwar die Amylase ganz gut ausgezogen, doch wenn man

mit der Konzentration heruntergeht, so werden die Auszüge immer mehr zu einem guten Medium für die Entwicklung der Bakterien und andere Mikroorganismen, die für die Amylase schädlich sind. Umgekehrt zeigen schon die Auszüge, die mit mehr als 90%igem Glycerin hergestellt wurden, eine kleinere enzymatische Kraft. Die geeignetste Glycerinkonzentration, die noch nach $2^1/_2$ Jahre langem Aufbewahren keine Mikroorganismen zur Entwicklung zuläßt und die verhältnismäßig sehr wenig die enzymatische Kraft des Auszuges schwächt, ist 50%. Durch die niedrigeren Glycerinkonzentrationen (20 bis 50%) werden die Auszüge auch gut aufbewahrt, aber doch nicht so gut wie durch die 50%ige, da sie schon den Kleinwesen, z. B. Hefen, Schimmelpilzen, leichter zugänglich werden. Oberhalb der Konzentration von 50% stößt man schon auf Schwierigkeiten wegen der höheren Viscosität und der verlangsamten Filtration der Lösungen, wenn man schon dabei einen größeren Bedarf an Glycerin nicht in Rechnung ziehen will.

Schon an dieser Stelle müssen wir das Augenmerk auf eine Erscheinung richten, die wir auch bei einer Reihe von anderen zu besprechenden Reagentien antreffen werden, daß nämlich die Glycerinauszüge größeres Verflüssigungsvermögen der Stärke haben als der wäßrige. Obiges kann durch ein genaueres Ausziehen des entsprechenden Enzyms oder durch eine anregende Wirkung der untersuchten Verbindung auf die Verflüssigungskraft verursacht werden.

In der Reihe der geeigneten Amylaselösungsmittel muß an zweiter Stelle das Pyridin hervorgehoben werden. Es ist im Wasser löslich und wurde von uns in drei Konzentrationen, 1%, 3% und 6%, benützt. Hier konstatierten wir dasselbe, was auch beim Glycerin bemerkt wurde, daß die Verflüssigungskraft höher ist als im wäßrigen Auszuge; die Ursache kann hier ähnlich sein wie beim Glycerin. Die Verzuckerungskraft ist hier aber weniger widerstandsfähig, natürlich besonders angesichts höherer Pyridinkonzentration. 1%iges Pyridin zieht sehr gut alle drei enzymatischen Kräfte aus; es ist aber nur ein schwaches Antisepticum und läßt also die Mikroorganismenentwicklung zu. Der Ausdruck dieses Verhaltens sind die Resultate unserer Untersuchungen mit demselben nach $2^1/_2$ Jahren. Der 3%ige Pyridinauszug zeigt ein höheres Verflüssigungsver-

mögen, gleichzeitig verzuckert er etwas schwächer als der vorige. Diese Kräfte werden darin verhältnismäßig gut aufbewahrt, denn nach $2^1/_2$ Jahren waren sie noch nicht vernichtet. Die $6\,^0/_0$igen Pyridinauszüge sind schon stärker beschädigt, was die Verzuckerungskraft anbelangt; gleichzeitig aber wird die Verflüssigungskraft so gut aufrecht erhalten, daß noch nach $2^1/_2$ Jahren 0,9 ccm des Auszuges 2 g Stärke zu lösen vermag. Wir müssen also das Pyridin als geeignetes Lösungsmittel zur Herstellung solcher enzymatischen Auszüge ansehen, die durch eine längere Zeit aufgehoben und untersucht werden sollen.

Das dem Pyridin nahestehende Chinolin ähnelt demselben auch in dieser Hinsicht; als schwach löslich im Wasser wurde es von uns in Form der in der Zimmertemperatur gesättigten Wasserlösung benützt. Die damit hergestellten Auszüge verflüssigen die Stärke wieder leichter als die rein wäßrigen. Die verzuckernde Kraft bleibt im Chinolinwasser gut erhalten, da sie sich während $1^1/_2$ Monaten ohne Änderung erhält, und die verflüssigende Kraft ist hier etwas schwächer, da sie schon nach $^1/_2$ Monat ein Sinken aufzuweisen hat. Das Chinolinwasser ist ein ziemlich schwach antiseptisches Mittel, denn nach 2 Monate dauerndem Aufbewahren zeigt es einen starken Bakterienwuchs, dessen Wirkung das Sauer- sowie Schwächerwerden des Auszuges war.

Zu derselben Gruppe, was nämlich das Verhalten der Amylase gegenüber anbetrifft, muß auch das Ammoniumsulfat in der Konzentration von ca. $10\,^0/_0$ zugerechnet werden. Die entsprechenden Auszüge sind keineswegs amylolytisch geschwächt, und obwohl in dieser Arbeit das Verhalten derselben beim Aufbewahren nicht untersucht wurde, geht es doch aus den vorigen Beobachtungen des Einen von uns hervor, daß sie sich gut aufheben lassen. Aber lange Zeit schützt das $10\,^0/_0$ige Ammoniumsulfat nicht vor der Entwicklung der Mikroorganismen. Höhere $(NH_4)_2SO_4$-Konzentrationen geben schwächere diastatische Auszüge wegen des schwächeren Lösungsvermögens für die Amylase, sowie wegen der Ausfällung derselben während der Zeit des Aufbewahrens.

Wir gehen jetzt über zu der zweiten Klasse der Verbindungen, die entweder die Amylase schädigen oder aber der Entwicklung von Mikroorganismen nicht entgegenzuwirken ver-

mögen. In erster Linie müssen diese Reagentien besprochen werden, die zur Herstellung der enzymatischen Lösungen, insbesondere der Amylaselösungen, benützt werden.

Das Wasser extrahiert die Amylase ausgezeichnet, weil ihre Auszüge in unseren Experimenten die höchsten Zahlen aufzuweisen haben, mit einigen Ausnahmen der verflüssigenden Kraft, die schon besprochen wurden oder noch berührt werden. Es wirkt aber nicht antiseptisch; es entwickeln sich Organismen, die mittelbar oder unmittelbar auf die Amylase schädlich wirken.

Die Kohlenwasserstoffe, wie Hexan, Benzol, Toluol, wurden von uns als solche oder als gesättigte Wasserlösungen benützt. Diese Verbindungen bilden natürlich als solche keine Lösungsmittel für die Amylase; ihre in der Zimmertemperatur erhaltenen Wasserlösungen haben in dieser Beziehung folgende Eigenschaften:

Die Hexanauszüge sind stärker verflüssigend als die wäßrigen (anfangs sogar 0,25 ccm für 2 g Stärke). Benzol und Toluol sind in ihrem Verhalten ganz gleich, sie extrahieren aber etwas schwächer die Amylase, jedenfalls schwächer als das Wasser, was die Verzuckerungskraft anbelangt. Die verflüssigende und dextrinierende Kraft wird durch diese Lösungsmittel ganz gleich, wie durch das Wasser selbst, ausgezogen. Toluol als das stärkste Antisepticum unter den drei genannten Kohlenwasserstoffen wirkt energisch der Entwicklung der Kleinlebewesen entgegen, aber so, wie es hier benützt wurde, reicht es dafür für längere Zeit nicht aus. Daher kommt es auch hier zum Sinken der amylolytischen Kräfte beim Aufbewahren.

Unter den aliphatischen Verbindungen gibt Chloroform, als eine in der Zimmertemperatur gesättigte Wasserlösung verwendet, einen Auszug, der eine wesentlich gehemmte Verzuckerungskraft aufweist, die Verflüssigungskraft und die dextrinierende bleiben unversehrt. Nur die letztere wird sehr wenig geschwächt. Beim längeren Aufbewahren unterliegen aber diese Auszüge einer Mikroorganismenflora und zeigen sehr starke Abnahme der amylolytischen Kräfte. Das $CHCl_3$ ist also weder als Lösungsmittel noch als enzymschützendes Mittel geeignet.

Wasser mit Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt gibt zwar eine Lösung, die die Amylase gut auszuziehen vermag, aber

wegen geringer Löslichkeit des Tetrachlorkohlenstoffs kein Antisepticum bildet.

Unter den Benzolabkömmlingen gibt das Nitrobenzol, eben so wie die anderen im Wasser unlöslichen Reagentien verwendet, einen Auszug, der nur wenig schwächer verzuckert als der rein wäßrige; derselbe wird aber vor Verderben nicht geschützt.

Dann gab das Anilin einen Auszug, der die Stärke mehr verflüssigte als der rein wäßrige, aber gleichzeitig war er schwächer, was die Verzuckerungskraft anbelangt. Die Auszuge sind nur schwach antiseptisch, und beim Aufbewahren konnten wir merkwürdigerweise ein schnelles und starkes Fallen der Verzuckerungskraft mit der gleichzeitig sich verhältnismäßig gut erhaltenden dextrinierenden und verflüssigenden Kraft konstatieren.

Trikresol, das durch S. S. Graves und Ph. Kober[1]) als ein gutes enzymatisches Antisepticum empfohlen wurde, ist eigentlich in der Konzentration 0,5 % ein besseres Antisepticum als das mit Toluol gesättigte Wasser und gibt wirklich einen starken Auszug, doch schwächt es beim Aufbewahren die Enzymwirkung ganz wesentlich.

Thymol (im Wasser im Verhältnis 1 : 1200 gelöst) gibt schon einen von dem wäßrigen bedeutend schwächeren Auszug, dessen Kraft noch weiter beim Aufbewahren unter Mikroflora-entwicklung sinkt.

In größerer Anzahl von Individuen und in mehreren Konzentrationen benützten wir die Alkohole, das Formalin, Aceton, sowie verschiedene Säuren. Die Alkohole, besonders das Äthylalkohol, sind bekannte und oft angewandte enzymatische Lösungs- und Ausfällungsmittel. Hier verwenden wir die drei ersten Alkohole, d. h. Methyl-, Äthyl- und n-Propyl-Alkohol. Im allgemeinen wirken sie unvorteilhaft auf die Amylase und vor allem auf ihre verflüssigende Kraft ein. Dieser Einfluß ist stärker bei dem niederen, z. B. Methylalkohol, als bei höherem, z. B. dem Propylalkohol. Dies kommt augenscheinlich auch beim Aufbewahren der Auszüge zur Geltung, wobei die Verflüssigungskraft unter der Alkoholeinwirkung besonders zu leiden hat. Natürlich wächst auch dieser schädigende Einfluß

[1]) Amer. Journ. of Chem. Soc. **36**, 751, 1914; ref. Wochenschr. f. Br. **1914**, 348.

mit dem Wachsen der Alkoholkonzentration; und zwar ist oberhalb 30% die Verflüssigungskraft schon zu weit geschwächt, um Anlaß zum Gebrauch so hochprozentigen Alkohols zu geben. Bei dieser Konzentration muß unserer Meinung nach der enzymatische Gebrauch der Alkohole sein Ende nehmen. Dies letztere muß besonders angesichts der allgemeinen und beliebten Anwendung der Alkohole in der Enzymatik hervorgehoben werden; vorzugsweise werden sie bei der Darstellung der Amylase als Reinigungsmittel und zwar bis zu den höchsten Konzentrationen verwendet.

Das Benehmen des Formalins der Amylase gegenüber war besonders interessant angesichts der zahlreichen Vorschläge, dasselbe als ein antiseptisches Mittel in dem Gärungsgewerbe zu benützen. Es können hier auch die Arbeiten von Szomló und Lászlóffy[1]), sowie die Arbeit von Petit[2]) angeführt werden, die das Formalin auch als enzymatisches Antisepticum anzuwenden empfehlen. Wie man aus Tafel I, A, Experiment Nr. 54—70 leicht ersieht, kann hier von dem Gebrauch höherer Formaldehydkonzentrationen nicht die Rede sein. Mit Lösungen unter 0,1% Formaldehydgehalt wird die Amylase gut ausgezogen. Alle noch wirkenden Auszüge sind zwar gegen Verderben gut geschützt, ihre enzymatischen Wirkungen aber fallen schnell unter dem starken Einfluß des Formalins. Die Resultate der Arbeit von Petit[3]) sind uns also völlig unklar, da wir sie gar nicht bestätigen können.

Obige Ergebnisse der Untersuchungen mit Formalin zeigen uns, daß das Verwenden von Formalin im Gärungsgewerbe nur unterhalb 0,5% möglich ist. Diese Verwendung aber kann nur dort stattfinden, wo das Formalin eine kurze Zeit auf die Amylase oder Malz einwirkt, z. B. also beim Waschen des Malzes u. dgl.

Das Aceton ist nur bis etwa 30% ein gutes Extraktionsmittel für die Amylase; es schwächt sie ein wenig und hält sie unverändert nur auf die Dauer von ca. 2 Tagen. Höhere Konzentrationen aber eignen sich schon gar nicht zum enzymatischen Gebrauch.

---

[1]) Oesterr. Chem.-Zeit. **7**, 126.

[2]) Compt. rend. d. Paris **161**, 39; ref. Wochenschr. f. Br. **1915**, 412.

[3]) l. c.

Das Chinin, in Wasser gelöst, ändert fast gar nicht die Eigenschaften des H_2O als Amylaselösungsmittel.

Die Säureeinwirkung auf die Amylase gipfelt darin, daß die Amylase von gewissen Konzentrationen an geschädigt und schließlich vernichtet wird, und zwar ist hier immer die verzuckernde Kraft empfindsamer als die verflüssigende Kraft. Bei den enzymatischen Reaktionen wird sehr oft eine anregende Wirkung kleiner Säurekonzentrationen beobachtet. Dieser Einfluß aber war bei unseren Experimenten nicht zu sehen, da die originelle Wasserstoffionenkonzentration des rein wäßrigen Auszuges schon oberhalb der anregenden Konzentration lag. — Als antiseptische Mittel können die Säuren nicht empfohlen werden; bei niedrigen Konzentrationen unterliegen die Auszüge dem Verderben und bei den höheren wieder der stark schädigenden Wirkung der Säuren. —

Die Basen mit einem stark ausgeprägten basischen Charakter sind natürlich auch von gewisser Grenze an sehr schädlich für die amylolytischen Enzyme und zwar am meisten für die Verzuckerungskraft, die von ihnen in noch stärkerem Maße als von den Säuren von der Verflüssigungskraft verschoben wird. Speziell können wir das beim NH_3 beobachten, dann bei zwei anderen anorganischen Verbindungen mit basischem Charakter. Die organischen Basen wie Pyridin und Chinolin wirken schon erheblich schwächer, obige Tendenz bleibt aber erhalten.

Weitere, z. B. Asparagin und Harnstoff, geben ganz gute Auszüge, die aber sehr schnell verfaulen. Der Harnstoff gibt sogar bei höherer Konzentration stärker verflüssigende Auszüge als das Wasser, nur unterliegt er, wie gesagt, dem Verderben mit der Amylase zusammen. Eine anregende Wirkung des Asparagins in den Auszügen, wie es die Arbeiten von Effront[1]) angeben, konnten wir weder beobachten noch bestätigen.

Interessant ist auch in seiner Einwirkung das Kupfersulfat, das ebenfalls die Verzuckerungskraft im Vergleich mit der Verflüssigungskraft sehr stark schädigt und also die beiden zur Verschiebung bringt.

---

[1]) Compt. rend. d. Paris **115**, 1324; Bull. Soc. chim. **31**, 1230.

Zusammenfassung.

1. In der Malzamylase konstatieren wir zwei deutlich voneinander unterschiedene Kräfte: die stärkeverflüssigende und die stärkeverzuckernde Kraft. Diese sehen wir als selbständig bestehende und wirkende Enzyme an, deren Einwirkung voneinander unabhängig ist.

2. Die stärkedextrinierende Kraft halten wir für eine Resultante beider genannten Kräfte unter Bedingungen, die heute noch nicht exakt bestimmt werden können, oder auch in diesem Falle für eine gesonderte Kraft mit einem ursächlichen Zusammenhange mit den beiden genannten. Zur letzten Ansicht wären wir mehr geneigt.

3. Die Jodreaktion verschiebt sich bei der Einwirkung der Amylase einmal stärker mit der verflüssigenden Kraft, einmal wieder mehr mit der Verzuckerungskraft; doch meistenteils korrespondiert sie mit der Verflüssigungskraft. Angesichts dessen halten wir die Jodreaktion und die darauf gegründeten Methoden, z. B. nach Wohlgemuth[1]), für ganz ungeeignet zur Bestimmung des Wertes der Amylasepräparate und speziell der Größe der verzuckernden Kraft. Doch können sie zur Bestimmung der dextrinierenden Kraft dienen, wenn man dieselbe als ein besonderes Enzym ansehen will.

4. Bei der Untersuchung der Amylase kann man, wie das schon T. Chrząszcz und K. F. Terlikowski[2]) betonen, nicht die allgemeine Kraft eines Amylasepräparates auf Grund einer seiner Funktionen besprechen; man muß hier alle deutlich hervortretenden Wirkungen, Enzyme, ins Auge fassen, zum mindesten die verflüssigende, verzuckernde und dextrinierende Kraft.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die stärkeausfällende Kraft nicht berücksichtigt.

5. Die bisher zur Herstellung der Auszüge der Amylase, zu ihrer Ausfällung oder zum Aufbewahren benützten Reagentien, wie reines Wasser, Alkohole in verschiedenen hohen Konzentrationen, Aceton, Chloroform, sind zu dieser Verwendung nicht geeignet.

---

[1]) Biochem. Zeitschr. **9**, 1, 1908.

[2]) l. c.

6. Zur Herstellung der Amylaseauszüge für Untersuchungen (wahrscheinlich auch anderer Enzyme) schlagen wir Glycerin in verschiedenen Konzentrationen, Pyridin und Chinolinwasser vor. Ihr Verhalten ist in dieser Hinsicht so vorteilhaft, daß erst jetzt exakte Prüfung der amylolytischen Präparate während einer längeren Zeitdauer ermöglicht wird.

7. Die Basen im allgemeinen und zwar sowohl organische wie besonders anorganische wirken in entsprechender Konzentration sehr günstig, wahrscheinlich auch anregend auf die Verflüssigungskraft und auf die dextrinierende Kraft ein. Jedoch ist ihr Einfluß ungünstig auf die Verzuckerungskraft.

8. Alkohole dagegen schädigen stark vor allem die verflüssigende und dextrinierende Kraft, schwächer die Verzuckerungskraft.

9. Eine ganze Reihe von Körpern ist der Amylase gegenüber neutral oder schädigt dieselbe gleichmäßig. Andere, wie Ammoniumsulfat, Harnstoff, Asparagin wirken günstig auf die Amylase ein, jedoch schützen dieselben nicht vor Mikroorganismen.

Über Resorption und Umsatz abnorm großer Gaben von Rohrzucker und Invertzucker.

Von

C. Brahm.

(Aus der chemischen Abteilung des tierphysiolog. Institutes der Kgl. Landw. Hochschule.)

(Eingegangen am 23. Dezember 1916.)

Weiter noch als über die Funktionen der verschiedenen Zuckerarten im pflanzlichen Leben gehen die Ansichten über deren Rolle und Bedeutung beim tierischen Stoffwechsel auseinander. Die Schwierigkeiten der physiologischen Fragestellung und der physiologisch-chemischen Methoden, die Verschiedenheiten im Verhalten der einzelnen Klassen des Tierreiches, endlich die in der Individualität der Versuchsobjekte begründeten Abweichungen lassen es erklärlich erscheinen, daß häufig selbst bezüglich prinzipiell wichtiger Grundlagen die Ergebnisse der Forschungen und die Deutungen dieser Ergebnisse keineswegs übereinstimmen, ja nicht selten sogar zu ganz entgegengesetzten Schlußfolgerungen führen.

Als zweifellos feststehend kann es betrachtet werden, daß die weitaus meisten Zuckerarten und die ihnen nahestehenden Kohlenhydrate vom tierischen Organismus rasch und in großen Mengen absorbiert werden. Im allgemeinen wirken sie hierbei eiweißsparend und erweisen sich in dieser Hinsicht den Fetten mindestens gleichwertig, vielleicht sogar überlegen[1]). Ferner steht fest, daß die Disaccharide vor der Aufnahme gespalten sein müssen, da unzerlegte Diosen kein Nährstoff für die Zellen sind. Inwieweit aber bei großen Dosen diese Darmarbeit quantitativ verläuft, ist wenig untersucht. Das Material, das sich über die Verdauung und die Schädlichkeit des Rohrzuckers

[1]) M. Rubner, Zeitschr. f. Biol. **15**, 192, 1879.

vorfindet, ist außerordentlich spärlich. Es liegen nur relativ wenig Arbeiten vor, die sich mit der Frage beschäftigen, was eintritt, wenn man außerordentlich große Mengen von Rohrzucker verfüttert. Diese Versuche sind sowohl an Menschen, wie an Hunden, wie auch an Kaninchen und Vögeln angestellt worden. Die Antworten auf die Frage, treten nachweisbare Mengen Zucker nach Genuß von Kohlenhydraten im normalen Harn auf und wieviel, gehen in verschiedener Richtung. Einige Forscher, wie Baumert[1]), Lehmann[2]), Kersting[3]), fanden bei Versuchen an Tieren und an sich selbst nach Aufnahme von Zucker in den Magen keinen Zucker im Harn. Zu dem gleichen Resultat kam Hoppe-Seyler[4]) bei seinen Versuchen an Hunden mit Rohrzucker. Nach Frerichs[5]) treten keine Spuren von Zucker in den Harn über, auch wenn sehr bedeutende Mengen davon genossen werden. Lehmann[6]) lebte 2 Tage lang ausschließlich von Zucker und Fett, ohne daß im Harn sich eine Spur gezeigt hätte. Budge[7]) erzielte bei seinen Versuchen an Menschen und Kaninchen negative Resultate, während er bei Hunden nach Fütterung von Rohrzucker im Harne Zucker gefunden haben will. C. Schmidt[8]) konnte nach Fütterung einer Katze mit Rohrzucker und Milch bedeutende Mengen „Harnzucker" im Harne nachweisen. Vogel[9]) sagt: „Nach dem Genuß von ungewöhnlich großen Mengen Zuckers läßt sich auch bei gesunden Menschen meist bald nachher eine ungewöhnlich große Menge von Zucker im Urin nachweisen." Cl. Bernard[10]) erwähnt, daß der Traubenzucker im Harn nach

[1]) Baumert, Jl. f. prakt. Chem. **54**, 361, 1851.

[2]) Lehmann, Lehrbuch d. physiol. Chem. **1**, 270, 273, 1853.

[3]) Kersting, Diss. inaugur. Lipsiae 1847, cf. Lehmanns Zoochemie, Heidelberg 1857, S. 197.

[4]) Hoppe-Seyler, Virchows Archiv **10**, 144 bis 170, 1856.

[5]) v. Frerichs, Über den Diabetes. Berlin 1884, S. 39 bis 40.

[6]) Lehmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. **2**, 375.

[7]) Budge, Arch. f. physiol. Heilkunde. III. Jahrgang, **1844**, 395 bis 616, 402 bis 408.

[8]) C. Schmidt, Charakteristik der epidemischen Cholera. Leipzig und Mitau 1850, S. 167, 168.

[9]) Vogel, Virchows Handbuch d. spez. Pathol. u. Therapie **6**, 490, Abteil. 2, Erlangen 1856 bis 1865.

[10]) Cl. Bernard, Leçons sur le diabète et la glycogenèse animale. S. 70. Paris 1877.

Genuß von Kohlenhydraten besonders dann auftritt, wenn der Betreffende vorher gefastet hat. Letzterer Forscher macht im Gegensatz zu den meisten anderen Autoren darauf aufmerksam, daß der Rohrzucker teils unverändert, teils als Invertzucker ausgeschieden wird[1]). Ludwig[2]) erwähnt in seinem Lehrbuch der Physiologie, daß der Harn öfter, doch nicht immer nach reichlichem Genuß von Rohrzucker diesen Stoff enthalte. Cl. Bernard[3]) teilt mit, daß der Harn nach Genuß von Rohrzucker und Invertzucker verhältnismäßig mehr Lävulose als Traubenzucker enthält, weil letzterer nach der Einwirkung von Fermenten viel leichter zerstört wird.

Neue Untersuchungen liegen von Rubner[4]) vor, der fand, daß der Rohrzucker seiner Hauptmasse nach als solcher zur Resorption gelangt und daß er mit einer gewissen Zähigkeit der Spaltung in Traubenzucker im Darm und im Blut widersteht. Der Kot war stets frei von Rohrzucker. Worm Müller[5]) konnte beim Menschen nach großen Rohrzuckergaben (250 g), nur Rohrzucker, dagegen keine Lävulose oder Traubenzucker nachweisen. Seegen[6]) fand, daß von Hunden bei ausschließlicher Fütterung mit Rohrzucker ein mehr oder minder großer Teil des Zuckers sowohl als Rohrzucker wie als Invertzucker ausgeschieden wird. Nach Voit[7]) tritt Rohrzucker beim Menschen nach Eingabe per os erst nach sehr großen Gaben in geringen Mengen im Harn auf, während er subcutan appliziert so gut wie quantitativ durch die Nieren wieder zur Ausscheidung kommt. Der Angabe von Voit widerspricht der Befund von Mering und Zuntz[8]). Nach kürzlich erschienenen Versuchen von Folkmar[9]) werden bei manchen Tieren dann erhebliche Anteile (10 bis 40 %) Rohrzucker im Körper zurück-

[1]) Cl. Bernard, Leçons sur le diabète et la glycogenèse animale. S. 333. Paris 1877.

[2]) Ludwig, Lehrbuch der Physiologie 1861, 394.

[3]) Cl. Bernard, Leçons sur le diabète et la glycogenèse animale. S. 330. Paris 1877.

[4]) M. Rubner, Zeitschr. f. Biol. 19, 354, 1883.

[5]) Worm-Müller, Arch. f. d. ges. Physiol. 34, 586, 1884.

[6]) J. Seegen, Arch. f. d. ges. Physiol. 37, 342, 1885.

[7]) Fritz Voit, Arch. f. klin. Med. 58, 544, 1897.

[8]) Mering und Zuntz, 32, 173 (1883).

[9]) E. O. Folkmar, diese Zeitschr. 76, 1 bis 54, 1916.

gehalten, wenn man große Mengen in die Blutbahn einspritzt. Es treten bei großen Dosen stets Schädigungen der Nieren ein, daß somit die Zurückhaltung nur darauf zurückzuführen ist, daß die Nieren unfähig sind, so große Mengen des körperfremden Stoffes auszuscheiden. Miura[1]) fand nach Einnahme von 320 g Rohrzucker 1%, nach Einnahme von 400 g 2,51% der eingenommenen Menge im Harn wieder. Nach Einnahme von 350 g Rohrzucker auf einmal beobachtete Berkefeld[2]) keine weitere Folge als Ohrensausen, Benommensein des Kopfes, brennenden Durst, doch wurden 46 g im Harn ausgeschieden, und zwar sank der Gehalt von 10% nach 1 Stunde, auf 6% nach 13 und auf 0% nach 18 Stunden. Monosen waren im Harn nicht vorhanden. Robertson[3]) fand durch Versuche am Menschen, daß im Magen Rohrzucker in geringer Menge invertiert wird, während im Dünndarm vollständige Inversion des Rohrzuckers stattfindet. Halász[4]) beschreibt Versuche über die Resorption und das biologische Verhalten der verschiedenen Zuckerarten im Dickdarm. v. Reuß[5]) berichtet über alimentäre Saccharosurie bei darmkranken Säuglingen, während Leopold[6]) über die Wirkung der verschiedenen Zuckerarten bei ernährungsgestörten Säuglingen seine Erfahrungen mit Rohrzucker mitteilt. Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Zuckerarten, darunter Rohrzucker, am Hunde beschreiben noch Sainmont[7]) und Heim[8]). Die Untersuchungen von Gaujoux[9]) beschäftigen sich ebenfalls mit alimentärer Saccharosurie. Wenn man einem gesunden Menschen auf den nüchternen Magen sehr große Mengen Rohrzucker, nämlich 250 bis 400 g, auf einmal verabfolgt, so tritt nach den Angaben einzelner Autoren etwas Zucker im Harn auf, und zwar Rohrzucker. Hieraus geht also hervor, daß im

[1]) K. Miura, Zeitschr. f. Biol. **32**, 293, 1895.
[2]) Berkefeld, Deutsche Zuckerindustrie **24**, 28, 1899.
[3]) Robertson, Edinburgh Medical Jl. Septemb. 1894.
[4]) D. Halász, Arch. f. klin. Med. **98**, 433, 1910.
[5]) v. Reiß, Wiener klin. Wochenschr. **1910**, 123.
[6]) J. S. Leopold, Zeitschr. f. Kinderheilk. **1**, 217, 1910.
[7]) Sainmont, Monatsschr. f. Kinderheilk. **10**, 579, 1911/12.
[8]) Heim, Monatsschr. f. Kinderheilk. **11**, 134, 1913.
[9]) Gaujoux, Ann. med. chir. **17**, 129, 1913, ref. Zeitschr. f. Kinderheilk. **6**, 1913.

allgemeinen die Darmresorption beim gesunden Menschen auch für Rohrzucker sehr schnell verläuft, und es ist ferner wahrscheinlich, daß der Rohrzucker in bereits gespaltenem Zustande resorbiert wird, nicht in unverändertem Zustande. Abgesehen also von geringfügigen Mengen übergetretenen Rohrzuckers verläuft beim gesunden Menschen sowohl die Aufspaltung des Rohrzuckers im Darm, wie auch die Resorption der Bruchstücke und die Verwertung der resorbierten Monosaccharide Traubenzucker und Fruchtzucker vollständig. Auf welche Ursachen der Übertritt von Rohrzucker in den Harn zurückzuführen ist, ist fraglich. Man kann annehmen, daß bei großen Dosen der Darm derartig mit Rohrzucker überschwemmt wird, daß sein Widerstand gegen die Resorption dieses Stoffes erlahmt und geringfügige Mengen durch die Darmwand durchtreten, wie dies ja auch bei anderen Stoffen, die im allgemeinen nicht resorbiert werden, der Fall ist. Bei dem außerordentlich widersprechenden Material war es von Interesse, die Versuche nochmals aufzunehmen. Dieselben wurden sowohl an Hunden wie an Menschen mit großen Dosen von Rohrzucker einerseits, von Kunsthonig (Invertzucker) andererseits ausgeführt. Die benötigten Zuckermengen wurden mir von dem Verband Deutscher Kunsthonigfabriken E. V. Magdeburg in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere, 2 Hündinnen von 9 bzw. 8 kg Gewicht, erhielten als Grundfutter 200 g Kartoffelflocken und 150 g Walfischfleisch, dazu steigende Rohrzuckergaben. Die erhaltenen Harnmengen wurden auf 2 l bzw. 1 l aufgefüllt. Die Untersuchung des Kotes auf Rohrzucker wurde in der Weise ausgeführt, daß derselbe mit heißem Wasser so lange extrahiert wurde, bis das Filtrat farblos geworden war. Dann wurde mit Bleiessig gefällt, entbleit und das Filtrat eingedampft. Der eingedickte Rückstand wurde direkt und nach Inversion mit verdünnter Salzsäure polarisiert. Auch wurde ein aliquoter Teil des Kotes mit 92%igem Alkohol verrieben, mit Bleiessig gefällt, auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und polarisiert. Die Rohrzuckergaben wurden den Hunden mit dem Futter vermischt gegeben, zum Teil wurde auch den Tieren das ganze Quantum (300 g) auf einmal in Wasser gelöst beigebracht. In keinem Fall gelang es, Rohrzucker im Harn, außer in Spuren, aufzufinden, der Kot wurde immer frei von Rohrzucker gefunden.

Der Nachweis desselben geschah durch Polarisation, Reduktion gegen Fehlingsche Lösung nach Inversion und durch das Verhalten gegen Phenylhydrazin.

Einzelheiten finden sich in nachstehenden Tabellen.

Rohrzuckerversuch Terrierhündin.

Datum	Harnmenge ccm	Polarisation des Harns direkt	Polarisation des Harns nach Inversion	Polarisation des Kotes direkt	Polarisation des Kotes nach Inversion	Zuckergabe g	Gewicht des Hundes kg
12. IX.	2000	—	—	—	—	—	9,030
13.	2000	—	—	—	—	—	9,060
14.	2000	—	—	—	—	—	9,045
15.	2000	—	—	—	—	—	9,050
16.	2000	—	—	—	—	80	9,060
17.	1000	—	—	—	—	100	9,075
18.	1000	—	—	—	—	100	9,085
19.	1000	—	—	—	—	150	9,092
20.	1000	—	—	—	—	200	9,090
21.	1000	—	—	—	—	200	9,080
22.	1000	—	—	—	—	—	9,095

Das Reduktionsvermögen des Harns nach Inversion mit verdünnter Salzsäure gegenüber Fehlingscher Lösung war negativ, ebenso der Ausfall der Osazonprobe.

Da die Tiere den Rohrzucker mit dem übrigen Futter zusammengemischt erhielten, so daß die Aufnahme desselben sich auf eine längere Zeitperiode erstreckte, erhielt am 12. X. das Tier nochmals 300 g Rohrzucker auf einmal in Wasser gelöst. Der Harn zeigte direkt keine Reduktion, nach der Inversion mit verdünnter Salzsäure Spuren. Das Polarisationsvermögen war negativ, ebenso das Verhalten gegenüber Phenylhydrazin. Der Kot war frei von Rohrzucker. Nach den hohen Zuckergaben enthielten die Faeces erhebliche Mengen unveränderter Kartoffelflocken. Größere Zuckergaben wurden von den Tieren verweigert.

Das Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung war sowohl direkt als nach Inversion mit verdünnter Salzsäure negativ, nur die Harne vom 20., 21. und 22. zeigten ein ganz schwaches Reduktionsvermögen. Die Osazonprobe war immer negativ. Am 12. X. erhielt das Tier ebenfalls 300 g Rohrzucker auf einmal. Das Polarisationsvermögen des Harns war negativ, das Reduktionsvermögen des Harns gegen Fehlingsche Lösung

war direkt negativ, nach Inversion mit verdünnter HCl ganz schwach. Die Osazonprobe verlief negativ. Die Faeces waren frei von Rohrzucker.

Rohrzuckerversuch mit Spitzhündin.

Datum	Harnmenge ccm	Polarisation des Harns direkt	Polarisation des Harns nach Inversion	Polarisation des Kotes direkt	Polarisation des Kotes nach Inversion	Zuckergabe g	Gewicht des Hundes kg
12. IX.	3000	—	—	—	—	—	8,050
13.	1000	—	—	—	—	—	8,072
14.	1000	—	—	—	—	—	8,060
15.	2000	—	—	—	—	50	8,060
16.	2000	—	—	—	—	80	8,070
17.	1000	—	—	—	—	100	8,060
18.	1000	—	—	—	—	100	8,063
19.	1000	—	—	—	—	150	8,080
20.	1000	—	—	—	—	200	8,080
21.	1000	Spur unter 0,05°	Spur	—	—	200	8,085
22.	1000	Spur unter + 0,05°	Spur	—	—	—	8,090

Die Versuche am Menschen wurden an einem gesunden Manne und einer gesunden Frau ausgeführt. Herr P. nahm am 16. X. 250 g Rohrzucker in Kaffee und Apfelmus verteilt, ebenso am 17. X. 250 g. Frau P. am 31. X. 300 g, am 1. XI. 300 g und am 2. XI. 300 g Rohrzucker in Malzbier aufgelöst. Die Harne zeigten sowohl direkt als auch nach der Inversion keine Drehung im Polarisationsapparat, ebenso war das Verhalten gegenüber Fehlingscher Lösung und Phenylhydrazin nach Inversion negativ. Die Faeces waren alle frei von Rohrzucker. Verf. hat ebenfalls an 3 Tagen je 300 g Rohrzucker genommen. Harn und Kot waren frei von Rohrzucker. Anschließend an diese Versuche wurden solche mit Kunsthonig (Invertzucker) ausgeführt. Derselbe enthielt 80,90% Trockensubstanz. Die Tiere erhielten die gleiche Menge Kartoffelflocken (200 g) wie oben, jedoch an Stelle des Walfischfleisches 100 g Pferdefleisch, dazu in steigenden Dosen den Invertzucker.

Am 16. X. 16 erhielten beide Tiere je 300 g Invertzucker in Wasser gelöst auf einmal. Die Harne enthielten Spuren reduzierender Substanz. Polarisation $\pm 0^{\circ}$, Verhalten gegen Phenylhydrazin negativ. An denselben Versuchspersonen wurden

die Versuche mit Kunsthonig angestellt. Herr P. verzehrte am 18. X. 16 600 g Invertzucker in Kaffee aufgelöst, Frau P. am 3. XI., 4. XI. und 5. XI. je 300 g Invertzucker. Die Harne zeigten ein negatives Reduktionsvermögen gegenüber Fehlingscher Lösung, ebenso war das Polarisationsvermögen negativ. Die Faeces waren alle frei von Zucker.

Versuch mit Kunsthonig. Terrierhündin.

Datum	Harnmenge ccm	Polarisation des Harns	Polarisation des Kotes	Reduktionsprobe Fehling	Osazonprobe	Honiggabe g	Gewicht des Tieres kg
25. IX.	1000	± 0°	+ 0°	—	—	—	9,045
26.	1000	± 0°	± 0°	—	—	75	9,038
27.	1000	± 0°	± 0°	—	—	75	9,045
28.	1000	± 0°	± 0°	—	—	150	9,065
29.	1000	± 0°	± 0°	—	—	150	9,080
30.	1000	± 0°	± 0°	—	—	250	9,098
1. X.	1000	± 0°	± 0°	—	—		9,085
2.	1000	± 0°	± 0°	—	—		9,078

Versuch mit Kunsthonig. Spitzhündin.

Datum	Harnmenge ccm	Polarisation des Harns	Polarisation des Kotes	Reduktionsprobe Fehling	Osazonprobe	Honiggabe g	Gewicht des Tieres kg
25. IX.	1000	± 0°	± 0°	—	—	—	8,059
26.	1000	± 0°	± 0°	—	—	75	8,050
27.	1000	± 0°	± 0°	—	—	75	8,050
28.	1000	± 0°	± 0°	—	—	150	8,085
29.	1000	± 0°	+ 0°	—	—	150	8,090
30.	1000	± 0°	+ 0°	—	—	250	8,090
1. X.	1000	± 0°	± 0°	—	—		8,080
2.	1000	± 0°	± 0°	—	—		8,075

Die Tierversuche ergaben sowohl nach Rohrzuckerfütterung wie nach Kunsthoniggaben keine Zuckerausscheidung im Harn. Daß hier nicht etwa Störungen in der Resorption vorhanden waren, die verhindert hätten, daß die Zucker überhaupt nicht vom Darm aufgenommen und in die Blutbahn übergeführt wurden, ergibt sich daraus, daß auch die Kotausscheidungen der Tiere völlig frei von Zucker waren. Es ist also der gesamte aufgenommene Zucker restlos dem Stoffwechsel der Tiere zugute gekommen. Diese günstige Resorption des Zuckers

dürfte zum Teil ihre Erklärung darin finden, daß die Tiere jetzt in Kriegszeiten nicht mit ihrer gewohnten Kost ernährt werden, sondern seit vielen Monaten fast ausschließlich mit stark kohlenhydrathaltiger Nahrung, nämlich mit Kartoffelflocken, ernährt sind. Es hat also augenscheinlich eine Anpassung sowohl der Verdaungsorgane wie auch der zuckeroxydierenden Körperzellen an die ungewohnte Kost stattgefunden.

In ganz entsprechender Weise verliefen die Versuche am Menschen, denen ebenfalls Rohrzuckergaben bis zu 300 g im Laufe eines Tages verabreicht wurden. Von Kunsthonig wurden von der einen Versuchsperson, wie oben ausgeführt, sogar 600 g an einem Tage verzehrt. Auch hier fand sich keine Spur von Zucker im Harn, ebensowenig enthielt der Kot irgendwelche nachweisbaren Mengen. Auch in diesem Falle darf man wohl daran denken, daß die außerordentlich kohlenhydratreiche Nahrung, wie sie auch bei den Menschen während der Kriegszeit notwendig ist, die an sich vorhandenen Anpassungsmechanismen des menschlichen Körpers soweit gesteigert hat, daß er imstande ist, selbst so außerordentlich große Mengen von Zucker resp. Kunsthonig anstandslos zu verarbeiten.

Über die wahre Natur der „acidotischen Konstitution" des Neugeborenen.

Von

K. A. Hasselbalch.

(Aus dem Laboratorium des Finsen-Instituts, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 26. Dezember 1916.)

Mit 1 Figur im Text.

Dem neueren Zusammenwerfen der Begriffe „Acidität" und „Acidose" gegenüber tut man, wie ich schon früher[1]) betont habe, am besten, an der ursprünglichen Definition des Acidosenbegriffs festzuhalten und unter „Acidosis" einen Zustand zu verstehen, in dem Salze unverbrennender organischer Säuren in ungewöhnlicher Menge im Blute vorhanden sind.

Der Nachweis eines solchen Zustandes mittels der physikalisch-chemischen Untersuchung des Blutes ist — abgesehen von den großen technischen Ansprüchen, die von der elektrometrischen C_{H^+}-Bestimmung im Blute gemacht werden — mit größeren prinzipiellen Schwierigkeiten verknüpft als allgemein angenommen wird.

Erstens gibt die C_{H^+}-Bestimmung im Blute nur über das Verhältnis zwischen Säure und Säurerest Aufschluß und besagt nichts über die absolute Konzentration der Gesamtsäuren im Blute, geschweige denn die einer bestimmten Säure. Sieht man von den kompensatorischen Kräften des Organismus ab, was bekanntlich immer eine gefährliche Abstraktion ist, darf man zwar behaupten, daß die Acidose die „reduzierte Acidität"[2]) des Blutes erhöht; die umgekehrte Schlußfolgerung ist aber

[1]) Diese Zeitschr. **74**, 56, 1916.

[2]) Die C_{H^+} bei 40 mm CO_2-Spannung, siehe Hasselbalch, a. a. O.

ganz unberechtigt; eine Erhöhung der reduzierten Acidität beweist nicht die Existenz einer Acidose, sondern kann ebensowohl durch eine primäre Herabsetzung der Alkalikonzentration des Blutes bewirkt worden sein. Die Entstehung eines solchen Zustandes durch den chronischen Sauerstoffmangel habe ich in früheren Arbeiten[1]) wahrscheinlich gemacht, indem ich gezeigt habe, daß Sauerstoffmangel die ständige Neutralitätsregulation durch Ammoniak abschwächt.

Dazu gesellt sich aber eine zweite Schwierigkeit, deren Gewicht mir erst durch Ylppös[2]) Behauptung einer „acidotischen Konstitution" des Neugeborenen recht augenfällig geworden ist, und die davon herrührt, daß der Blutfarbstoff keine indifferente Beimengung des Plasmas darstellt, sondern als Elektrolyt für die Reaktion des Blutes mitbestimmend ist[3]). Eine Schwierigkeit dieser Art wäre somit umgangen worden, wenn die C_H-Bestimmung nicht im Blute, sondern in dem (frisch hergestellten) Serum vorgenommen wäre.

Um es gleich zu sagen: Wenn Ylppö auf Grund elektrometrischer Reaktionsbestimmungen und Barcroftscher O_2-Bindungskonstanten des CO_2-freien Blutes eine „acidotische Konstitution" des neugeborenen Kindes behaupten will, so trage ich, auch ohne Nachprüfung der unzweifelhaft richtigen Befunde, kein Bedenken, zu erklären, daß hier eine Mißdeutung der Beobachtungen vorliegt.

Gefunden wurde, daß das Gesamtblut des neugeborenen Kindes nach der Sättigung mit einer CO_2-armen Luft bedeutend saurer reagiert — Sauerstoff schlechter bindet — als das Blut des älteren Kindes oder des Erwachsenen, in derselben Weise behandelt. Bei physiologischen CO_2-Spannungen war dagegen kein Unterschied nachweisbar.

Wie ist nun dieser Befund zu verstehen? Unzweifelhaft anders als von Ylppö vermutet.

Das Oxyhämoglobin ist ein Ampholyt, der bei neutraler

---

[1]) Diese Zeitschr. **74**, 48, 1916.

[2]) Arvo Ylppö, Neugeborenen-, Hunger- und Intoxikationsacidosis in ihren Beziehungen zueinander. Zeitschr. f. Kinderheilk. **14**, 1916.

[3]) Hasselbalch und Lundsgaard, diese Zeitschr. **38**, 87, 1912. — Hasselbalch, diese Zeitschr. **46**, 428, 1912 und **78**, 1916.

Reaktion (bei 38° p_H etwa 6,9) isoelektrisch ist[1]). Eine Reaktion von $p_H = 6{,}9$ kann in gewöhnlichem Blute durch eine CO_2-Spannung von etwa 150 mm verursacht werden; bei diesem p_H weder bindet noch entbindet das Oxyhämoglobin Säure oder Base. Bei saurer Reaktion ist das Oxyhämoglobin eine Base, die CO_2 bindet, bei alkalischer Reaktion eine Säure, die aus den Bicarbonaten des Blutes CO_2 vertreibt, und zwar wird die Oxyhämoglobinsäure bei fallender CO_2-Spannung — steigendem p_H — immer stärker dissoziiert und kann bei genügender Konzentration bei der CO_2-Spannung 0 alle chemisch gebundene Kohlensäure aus dem Blute vertreiben, wie es ja eine altbekannte Tatsache ist, daß gewöhnliches Blut durch Vakuum ohne Säurezusatz kohlensäurefrei gemacht werden kann, was mit Serum oder Plasma nicht gelingt.

Bei dieser Sachlage wird man unschwer einsehen können, daß bei der CO_2-Spannung 0 eine hämoglobinreiche Blutportion saurer reagieren muß als eine hämoglobinarme, *ceteris paribus*, während in der Nähe der isoelektrischen Reaktion des Oxyhämoglobins, wo die Säurewirkung des Farbstoffs wegfällt, die beiden betreffenden Blutsorten genau dieselbe Reaktion zeigen müssen.

Wenn ich für den Vergleich verschiedener Blutsorten mit Bezug auf Acidosis eine Normalspannung von 40 mm CO_2 benutze, so kann ich dadurch einen höchst unbedeutenden Fehler begehen, der bei den praktisch vorkommenden Variationen des Hämoglobingehaltes des Blutes den Betrag 0,02 des Wertes von p_H nur selten überschreitet, und der dadurch gerechtfertigt wird, daß die auf 40 mm CO_2 „reduzierte Wasserstoffzahl" des Blutes oft eine direkte physiologische Bedeutung hat. Bei der CO_2-Spannung 0 aber ist das Oxyhämoglobin eine so starke Säure, daß die Konzentration dieser Säure von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Der untenstehende einfache Versuch (Tabelle I) ist eine schlagende Veranschaulichung von der Bedeutung einer passenden Wahl der Vergleichsspannung von Kohlensäure.

---

[1]) Michaelis und Takakashi, diese Zeitschr. 29, 1910. — Hasselbalch, ebenda 78, 1916 und eine bald zu veröffentlichende Abhandlung.

Defibriniertes Rinderblut wurde etwa 10 Minuten lang zentrifugiert und auf diese Weise eine obere, blutkörperchenarme Portion A und eine untere, blutkörperchenreiche Portion B des Blutes dargestellt. Nach erfolgter Sättigung mit atmosphärischer Luft enthielt A 14,15 Vol.-% O_2, an das Hämoglobin gebunden, B auf gleiche Weise 28,4 Vol.-% O_2. Da 1 g Hämoglobin maximal 1,34 ccm O_2 bindet, war das Hb.-% in A 10,5, in B 21,2.

Mittels der von mir verwandten gasanalytischen Methode[1]) wurde nun in A und B die Wasserstoffzahl bei 1,5 mm und bei 31,2 mm CO_2 bestimmt. Das Ergebnis war (Tabelle I):

Tabelle I.

Rinderblut. Temp. 38°.

	Hämoglobin %	CO_2 mm	CO_2 gebunden Vol.-%	p_H
A	10,5	1,5	17,8	8,38
B	21,2	1,5	5,2	7,88
A	10,5	31,2	48,2	7,43
B	21,2	31,2	37,3	7,35

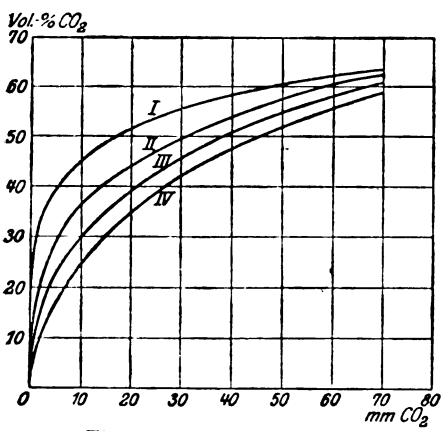


Fig. 1. Menschenblut, 38°.
I. 3,4% Hämoglobin
II. 10,0 „ „
III. 11,8 „ „
IV. 16,0 „ „

Bei der ganz niedrigen CO_2-Spannung ist der p_H des hämoglobinreichen Blutes um 0,50 niedriger als der des hämoglobinarmen Blutes. Bei der höheren CO_2-Spannung ist der Unterschied noch deutlich wahrnehmbar, obschon viel geringer, nämlich 0,08. Eine Erhöhung der CO_2-Spannung bewirkt bei dem hämoglobinreichen Blute eine verhältnismäßig kleine, bei dem

[1]) Die Berechnung der Wasserstoffzahl des Blutes aus der freien und gebundenen Kohlensäure desselben usw. Diese Zeitschr. 78, 1916.

hämoglobinarmen Blute eine sehr große Erniedrigung des p_H. Das heißt: die spezifische Pufferwirkung des Blutes hängt von seinem Hämoglobingehalt ab, oder, um mit Ylppö zu reden: die Einengung der „Regulationsbreite" des Blutes ist nicht, wie Ylppö meint, ein Indicator für Acidosis, sondern beweist nur, daß wir ein sehr hämoglobinreiches Blut vor uns haben.

Genau dasselbe Ergebnis geht aus den folgenden, mehr zufälligen Beobachtungen an Menschenblut hervor. Das Blut entstammt Patienten, die anderer Zwecke wegen untersucht wurden. Ich habe solche Fälle ausgewählt, die große Variationen des Hämoglobingehaltes darbieten (Tabelle II).

Tabelle II.

Defibriniertes Menschenblut. Temp. 38°.

	Hämoglobin %	CO_2 mm	CO_2 Vol.-%
Fall I. Anaemia perniciosa	3,4	1,5	33,0
		27,4	54,8
		39,7	58,3
		62,6	62,3
Fall II. Uraemia (halbkomatös)	11,8	1,5	14,4
		17,3	38,1
		21,8	41,0
		39,5	50,4
		68,7	59,7
Fall II. (später, in Genesung)	10,0	1,5	19,3
		18,7	43,1
		28,5	49,4
		45,0	56,6
		58,9	60,9
Fall III. (Diabetes mellitus, Anfang des 3. Hungertags)	16,0	1,5	8,7
		20,4	37,9
		38,3	46,2
		62,9	56,6

Aus den Bestimmungen der Tabelle sind die CO_2-Bindungskurven der Fig. 1 konstruiert worden, die das mit dem steigenden Hämoglobingehalt abnehmende CO_2-Bindungsvermögen der Blutproben sehr deutlich veranschaulichen. Aus den Kurven berechne ich (Tabelle III) die folgenden Werte von p_H:

Tabelle III.

	p_H des Blutes bei 38° und		
	1,5 mm CO_2	40,0 mm CO_2	70,0 mm CO_2
Blut mit 3,4% Hb. . .	8,61	7,40	7,18
„ „ 10,0% „ . .	8,41	7,37	7,18
„ „ 11,8% „ . .	8,29	7,345	7,17
„ „ 16,0% „ . .	8,09	7,32	7,16

Während bei der CO_2-Spannung 1,5 mm die p_H-Werte weit differieren, und zwar ganz eindeutig in der Weise, daß das hämoglobinreiche Blut „saurer" erscheint als das hämoglobinarme, sind bei der physiologischen CO_2-Spannung von 40 mm die Unterschiede bedeutend kleiner und bei 70 mm CO_2 fast vollkommen verschwunden. Von einer Acidosis ist in keinem der hier untersuchten Fälle die Rede, nur von sehr großen Variationen des Hämoglobingehaltes des Blutes.

Hiernach darf ich behaupten, daß Ylppö keine „acidotische Konstitution" des Neugeborenen nachgewiesen, sondern in mühevoller Arbeit die altbekannte Tatsache demonstriert hat, daß der neugeborene Säugling ein sehr hämoglobinreiches Blut besitzt. Ich glaube, daß diese Erklärung der vorliegenden Befunde auch quantitativ vollkommen zutrifft.

Nach Leichtenstern[1]) ist der Hämoglobingehalt des Blutes unmittelbar nach der Geburt ungefähr doppelt so groß (100:55) als im Alter von $^1/_2$ bis 5 Jahren. Nach Ylppö liegen die Verhältnisse bezüglich der aktuellen Reaktion (nach Michaelis bei Zimmertemperatur gemessen) etwa so, wie die untenstehende Zusammenstellung[2]) angibt:

	p_H des CO_2-freien Blutes[3])	p_H des Venenblutes
Neugeborenes Kind . . .	ca. 8,0	ca. 7,45
Älteres Kind	ca. 8,35	ca. 7,45

[1]) Untersuchungen über den Hämoglobingehalt. Leipzig 1878. (Zitiert nach Nagels Handbuch der Physiologie, Ergänzungs-Bd., S. 57, 1910.)

[2]) Siehe die Kurvenzeichnung bei Ylppö, a. a. O. S. 40.

[3]) Ylppö ist sich darüber klar, daß das Blut nicht absolut CO_2-frei war. A. a. O. S. 25, Fußnote.

Ein Vergleich mit meinen Tabellen I und III zeigt, daß Unterschiede dieser Größenordnung einzig und allein von dem hohen Hämoglobingehalt des neugeborenen Kindes herrühren können.

Selbst Porges[1]), der für meinen Vorschlag, die ursprüngliche Definition des Acidosebegriffes gelten zu lassen und jede später eingebürgerte Erweiterung derselben zur Bezeichnung der aktuellen Reaktion des Blutes wieder auszurotten, nicht begeistert ist, wird wohl zugeben müssen, daß die Bezeichnung eines hypernormalen Hämoglobinreichtums des Blutes als „Acidosis" für das weitere Eindringen in die ungelösten Probleme der acidotischen Stoffwechselvorgänge nicht gerade fördernd ist.

Bei physiologischen CO_2-Spannungen von rund 40 mm spielt, wie gesagt, die Säurewirkung des Blutfarbstoffs eine recht untergeordnete Rolle. Will man die reduzierte Wasserstoffzahl des Blutes im Interesse der Acidosefrage benutzen, sollte man doch immer über den Hämoglobingehalt des Blutes unterrichtet sein, um sich gegen Fehlschlüsse zu wehren. Die von Gammeltoft und mir[2]) und später mit verbesserter Methode von mir[2]) gelieferte Beweisführung für die Existenz einer Graviditätsacidose leidet an keiner dem Hämoglobin entstammenden Schwäche, indem bei den untersuchten Frauen der Hämoglobingehalt des Blutes vor und nach der Geburt absolut oder praktisch gleich groß war.

Bei mehreren pathologischen Zuständen, z. B. Anaemia perniciosa, Cholera, Intoxikationen, und bei den physiologischen Wirkungen des Höhenklimas muß aber die Hämoglobinkonzentration des Blutes für die Neutralitätsregulation eine recht bedeutende Rolle spielen. Wenn eine Erniedrigung des reduzierten p_H im Blute um 0,05 durch die Atmung allein kompensiert werden soll, so muß die alveolare CO_2-Spannung um etwa 8 mm herabgesetzt werden. Und solche Unterschiede liegen, dem Obenstehenden zufolge, innerhalb des Wirkungsbereiches der variierenden Hämoglobinkonzentration des Blutes.

---

[1]) Diese Zeitschr. 77, 241, 1916.

[2]) Diese Zeitschr. 68, 1915 und 78, 1916.

Zusammenfassung.

Will man die aktuelle Reaktion des Blutes für die Diagnose eines acidotischen Zustandes verwerten, so darf die Reaktionsbestimmung nicht bei niedriger CO_2-Spannung geschehen, da bei so alkalischer Reaktion das Oxyhämoglobin eine so starke Säure ist, daß seine Konzentration ausschlaggebend wird.

Eine Acidosis des neugeborenen Kindes existiert wahrscheinlich nicht, sondern wird bei ungeeigneter Versuchsmethode von dem Hämoglobinreichtum des Blutes vorgetäuscht.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

XXIX. Mitteilung.

Nachweis der Stoffwechselwirkung der Schilddrüse mit Hilfe eines eiweißfreien und jodarmen Schilddrüsenpräparates.

Von

J. Abelin.

(Eingegangen am 26. Dezember 1916.)

Mit 3 Figuren im Text.

Wie jedes große und wichtige Problem, standen auch die Schilddrüsenfrage und unsere Ansichten über das „wirksame Prinzip" der Schilddrüse immer im Zeichen der Zeit.

In einer Periode, in der man das Eiweiß als Träger der hauptsächlichen Funktionen des Organismus betrachtete, war es sozusagen eine Sache der Selbstverständlichkeit, daß auch die Schilddrüse ihre lebenswichtige Bedeutung der Anwesenheit eines Eiweißkörpers verdanke. Baumann, der Entdecker des Jods in der Schilddrüse, nannte diesen Körper Jodothyrin (zuerst Thyreojodin) und bezeichnete ihn als die wirksame Substanz der Schilddrüse, dies um so mehr, als diese eiweißähnliche Verbindung sich als jodhaltig erwiesen hat und auch günstige Resultate bei der Behandlung von Kröpfen zeigte. Gegen diese Annahme Baumanns sprach aber die Tatsache, daß das Jodothyrin nicht etwa präformiert in der Schilddrüse vorkommt, sondern ein Kunstprodukt darstellt, das erst bei der Säurehydrolyse der Schilddrüseneiweißkörper entsteht und das nach den Auffassungen von v. Fürth und C. Schwarz[1])

[1]) v. Fürth und C. Schwarz, Arch. f. d. ges. Physiol. **124**, 142, 1908.

zur Gruppe der melanoidinartigen Kondensationsprodukte zu zählen ist. Es ist dann aber Oswald[1]) gelungen, einen in der Schilddrüse vorkommenden jodhaltigen Eiweißkörper zu isolieren, den er wegen seiner Globulinnatur als Thyreoglobulin bezeichnet. Ebenso wie aus der Schilddrüse selbst, läßt sich auch aus diesem Thyreoglobulin durch Kochen mit Säuren das Jodothyrin gewinnen. Damit war der Widerspruch in den früheren Ansichten Baumanns behoben, und Oswald bezeichnete diesen Eiweißkörper als das eigentliche Schilddrüsensekret. Nun haben sich unsere Anschauungen über die Rolle (nicht etwa über die Bedeutung) der Eiweißkörper im Haushalte des Organismus seit der Entdeckung des Jodothyrins oder Thyreoglobulins grundlegend geändert. Die Auffindung eines speziellen Ferments in unserem Darme, des Erepsins von Cohnheim, das die Peptone in die tieferen Spaltprodukte des Eiweißes, in die Aminosäuren, überführt; ferner das von Kutscher und Seemann nachgewiesene stete Vorkommen von Aminosäuren im Darmkanal; endlich die mit Erfolg von O. Loewi[2]) und von Abderhalden[3]) und seinen Mitarbeitern durchgeführten Ernährungsversuche, in denen an Stelle von Eiweiß Aminosäuren kamen; alle diese Tatsachen zwangen zu einer Revision unserer Anschauungen, und die Annahme, daß im Zellstoffwechsel (vielleicht neben den Eiweißkörpern) gerade den einfachen, wasserlöslichen Eiweißabbauprodukten eine sehr hohe Bedeutung zukommt, erscheint sehr wahrscheinlich.

Es ist klar, daß all diese Beobachtungen nicht ohne Rückwirkung auf unsere Ansichten über die Natur des inneren Sekrets der Schilddrüse bleiben können.

Bei der Diskussion der Frage über die Natur des wirksamen Prinzips der Schilddrüse sind aber außerdem noch folgende Gesichtspunkte maßgebend.

Erstens sind die Befunde an anderen Organen mit innerer Sekretion zu erwähnen, und zwar sowohl die bereits seit mehreren Jahren erfolgte Aufklärung und Synthese des Nebennierensekretes, des Adrenalins, als auch die in neuerer Zeit durch-

[1]) A. Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 1899.

[2]) O. Loewi, Arch. f. experim. Pathol. 48, 1902; Zeitschr. f. Biol. 28, 1905.

[3]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42ff.

geführten Untersuchungen über die wirksamen Bestandteile der Hypophyse. Zwar sind wir leider in der Erforschung der Hypophysenstoffe nicht so weit wie auf dem Gebiete des Adrenalins; die von H. Fühner[1]) veröffentlichten Befunde haben aber deutlich gezeigt, daß auch hier die Wirksamkeit des Organs an die Anwesenheit einfacher, nicht eiweißartiger Produkte geknüpft ist.

Zweitens sind die Ergebnisse auf dem Schilddrüsengebiete selbst zu berücksichtigen. Wenn die Organotherapie wirkliche Erfolge irgendwo zu verzeichnen hat, so ist es eben bei der Schilddrüsenbehandlung durch Darreichung von frischer oder getrockneter Schilddrüse. Nun werden aber die verfütterten Schilddrüseneiweißkörper beim Passieren des Magendarmkanals zerlegt, und zwar, wie wir früher gesehen haben, in relativ einfache Bestandteile.

Diese Feststellungen bringen die Eiweißtheorie der Schilddrüsenwirkung auf einen unsicheren Boden und zeigen zugleich, daß unsere Kenntnisse über das Wesen und die Wirkungsweise der Schilddrüse noch recht dunkel sind.

Dieser Widerspruch in den Tatsachen, daß einerseits das Schilddrüseneiweiß therapeutisch wirksam ist, und daß andererseits dieses Eiweiß im Körper der Verdauung und Aufspaltung unterliegen muß[2]), regt immer zu neuen Untersuchungen an.

Die letzten Jahre brachten uns in dieser Richtung eine ganze Reihe neuer Arbeiten, und es ist unzweifelhaft, daß wir jetzt ein Aufleben der Frage nach den wirksamen Bestandteilen der Schilddrüse zu verzeichnen haben. Meiner Meinung nach spielen hier eine bedeutende Rolle die sehr günstigen Erfahrungen, die man mit den Extrakten aus der Hypophyse gemacht hat. Es lag ja auf der Hand, auch die Chemie und Physiologie der Schilddrüse einer neuen Bearbeitung zu unterziehen und zu erforschen, ob nicht auch hier, wie beim Nebennieren- oder Hypophysensekret, einfach gebaute Produkte nichteiweißartiger Natur an der Funktion der Schilddrüse beteiligt

---

[1]) H. Fühner, Deutsche med. Wochenschr. **1913**, Nr. 11; **1914**, Nr. 6.

[2]) Oswald glaubt, das Thyreoglobulin werde im Magendarmkanal nicht gespalten, sondern käme als solches zur Resorption. Es liegt aber chemisch weder ein Grund noch ein Beweis für eine Sonderstellung dieses Eiweißkörpers vor.

sind oder wenigstens beteiligt sein können. Der beste Weg zur Untersuchung solcher Fragen ist die Anwendung von eiweißfreien Extrakten aus der Schilddrüse oder der fermentative Abbau der Schilddrüsensubstanz bis zu den tiefsten bis jetzt bekannten Spaltungsprodukten. Beide Methoden sind nicht neu. Extrakte aus der Schilddrüse werden in der Substitutionstherapie seit langem gebraucht, und auch Versuche mit den bei der Verdauung der Schilddrüseneiweißstoffe entstehenden Substanzen sind bereits ausgeführt worden[1]). In neuerer Zeit hat ein eiweiß-, lipoid- und fast jodfreier Auszug aus der Schilddrüse (Thyreoglandol von Hoffmann-La Roche & Co.) die Aufmerksamkeit einiger Forscher erregt und Anlaß zu zahlreichen Untersuchungen gegeben. So haben Bürgi und v. Traczewski[2]) das Präparat auf seine Herzwirkung untersucht. Im hiesigen physiologischen Institut wurde in den letzten Jahren neben anderen Schilddrüsenpräparaten auch von diesem Schilddrüsenextrakt bei zahlreichen Untersuchungen verschiedener Art Gebrauch gemacht. W. Axentjan[3]) hat das Thyreoglandol mit Hilfe der Acetonitrilreaktion untersucht. Über den Wert sowie über die Spezifität dieser von R. Hunt eingeführten Reaktion sind die Meinungen geteilt; es ist aber durch zahlreiche Autoren festgestellt worden, daß das Verfüttern von Schilddrüse oder Schilddrüsenpräparaten (Thyradenpulver, Tabloid, Thyroid Gland usw.) die Tiere widerstandsfähiger gegen das giftige Acetonitril macht. W. Axentjan hat durch Einspritzungen von Thyreoglandol eine deutliche Resistenzerhöhung der weißen Mäuse gegen das Acetonitril erzielt. Daraus geht hervor, daß dieses jodarme und eiweißfreie Präparat sich, falls man die Acetonitrilreaktion als beweisend ansieht, eine Ansicht, der ich nicht beipflichten möchte, als ebenso wirksam erweist, wie andere als vollwertig angesehene Schilddrüsenpräparate. Richardson[4]) und Kakehi[5]) haben die Wirkung dieses Auszuges auf das isolierte Herz normaler, sowie auch thyreoidektomierter Säugetiere geprüft. Diese Prüfung war aus folgendem Grunde wertvoll: Vor

[1]) Vgl. E. Pick und Pineles, Zeitschr. f. experim. Pathol. 7.
[2]) Bürgi und v. Traczewski, diese Zeitschr. 66.
[3]) W. Axentjan, Inaug.-Diss., Basel 1914.
[4]) H. Richardson, Zeitsch. f. Biol. 67.
[5]) S. Kakehi, Zeitschr. f. Biol. 67.

mehreren Jahren konnte Asher den Nachweis erbringen, daß die Reizung des Nervus splanchnicus die Absonderung von Adrenalin veranlaßt. Aber noch vor dieser Feststellung ist es Asher und Flack[1]) durch Reizung der zur Schilddrüse führenden Nerven gelungen, nachzuweisen, daß die Schilddrüse an den Organismus ein inneres Sekret abgibt und daß nervöse Erregungen auf die Absonderung dieses Sekretes einen Einfluß haben können. Asher und Flack haben dabei auch festgestellt, daß das Schilddrüsensekret keine Wirkung auf die Pulszahl sowie auf den Blutdruck hat.

In Übereinstimmung damit fanden auch Richardson und Kakehi, daß das Thyreoglandol auf die Herztätigkeit ohne Einfluß ist, indem die Zugabe des Präparates weder eine Veränderung der Schlagkraft, noch eine Erhöhung oder Verminderung der Schlagzahl hervorruft. Dagegen konnten sie zeigen, daß die Wirkung von Adrenalin auf das isolierte überlebende Säugetierherz durch Schilddrüsenextrakt oder Thyreoglandol verstärkt wird. Dieser Befund spricht zugunsten der früher von Asher und Flack und Asher und v. Rodt geäußerten Ansicht, wonach das Schilddrüsensekret eine Erregbarkeitssteigerung des sympathischen und parasympathischen Nervensystems hervorruft.

H. Streuli[2]) und M. Eiger[3]) benutzten das Thyreoglandol bei den Untersuchungen an den überlebenden Organen mit glatter Muskulatur der Säugetiere (an der Blase nach Asher und am Darm nach Magnus). Alle diese Befunde sind neuerdings von L. Asher[4]) im Zusammenhange ausführlich besprochen worden.

Die Erforschung der Schilddrüsenfrage wird sehr wesentlich dadurch erleichtert, daß es einige ganz charakteristische Reaktionen gibt, welche die Schilddrüsenwirkung von der Wirkung anderer Organsubstanzen unterscheiden lassen. Neben einer ganzen Reihe sehr wertvoller, aber nicht typischer Reaktionen besitzt die Schilddrüse selbst, sowie einige Schilddrüsenprodukte einen ganz hervorragenden Einfluß auf den allgemei-

[1]) Asher und Flack, Zeitschr. f. Biol. **55**, 83, 1910.
[2]) H. Streuli, Zeitschr. f. Biol. **66**, 197.
[3]) M. Eiger, Zeitschr. f. Biol. **1917**.
[4]) L. Asher, Deutsche med. Wochenschr. **1916**, Nr. 34.

nen Stoffwechsel, sowie auf die sogenannten Ausfallserscheinungen, die sich entweder bei ungenügender Tätigkeit oder bei der Entfernung der Schilddrüse einstellen. Von diesen beiden typischen Reaktionen ist für den Experimentalforscher der Einfluß auf den Stoffwechsel am besten zugänglich, da das Studium der Myxödembehandlung ein geeignetes klinisches Material voraussetzt, und die Stoffwechselwirkung ist zudem vom Standpunkt der experimentellen Physiologie die wichtigste und reinste.

Die Stoffwechselwirkung der Schilddrüse ist zuerst durch die grundlegenden Arbeiten von B. Schöndorff[1]) und Fr. Voit[2]) festgestellt. Diese Autoren sowie zahlreiche andere fanden übereinstimmend, daß durch Schilddrüsenzufuhr die Stoffwechselvorgänge gesteigert werden. Die Stickstoffausscheidung im Harn, die Kohlensäureabgabe, sowie die Sauerstoffaufnahme nehmen beträchtlich zu.

Es ist dann Magnus-Levy[3]) gelungen nachzuweisen, daß beim Myxödematösen, der bekanntlich einen bis auf die Hälfte herabgesetzten Stoffwechsel hat, die Zufuhr von Schilddrüsensubstanz eine Steigerung des Stoffwechsels auf die normale Höhe zur Folge hat.

Dank diesen, sowie zahlreichen anderen Untersuchungen (Roos, Mayerle u. a. mehr) gilt daher die Stoffwechselsteigerung als die sicherste „biologische Reaktion" auf die Schilddrüse, sowie auf einige vollwertige Schilddrüsenprodukte. Diese Hebung des gesamten Stoffwechsels ist besonders beim Fehlen der Schilddrüse ausgesprochen, eine Wirkung am normalen Menschen oder normalen Tiere ist dagegen nicht immer festzustellen.

Um einen besseren Einblick in die Wirkungsweise des erwähnten eiweißfreien Schilddrüsenpräparates zu gewinnen, habe ich, einer Anregung Prof. Ashers folgend, eine Untersuchung über den Einfluß dieses Präparates auf den Stoffwechsel unternommen[4]).

[1]) B. Schöndorff, Arch. f. d. ges. Physiol. **67**, 395.

[2]) Fr. Voit, Zeitschr. f. Biol. **35**, 116, 1897.

[3]) Magnus-Levy, Zeitschr. f. klin. Med. **1897**; Handb. d. Pathol. d. Stoffw. v. C. v. Noorden **2**, 1907.

[4]) Die benötigten großen Quantitäten des Präparates wurden in dankenswerter Weise von der Firma Hoffmann-La Roche & Co. zur Verfügung gestellt.

Es gelang mir dabei nachzuweisen, daß dem eiweißfreien Auszuge aus der Schilddrüse die charakteristische Wirkung auf den Stoffwechsel zukommt. Unter dem Einflusse dieser Schilddrüsensubstanz trat sowohl beim normalen, als auch beim thyreoidektomierten Hund eine sehr wesentliche Steigerung des Hungereiweißumsatzes ein. Die erhöhte Eiweißzersetzung war öfters von einer gesteigerten Wasserausscheidung begleitet. Die eiweißfreien Produkte der Schilddrüse üben also auf den Eiweißstoffwechsel die gleiche Wirkung, wie die Gesamtschilddrüse oder die Schilddrüseneiweißkörper aus.

Diese von mir gefundene Tatsache steht im besten Einklang mit den neueren Erfahrungen auf dem Schilddrüsengebiete. Vor einigen Jahren ist es Gudernatsch[1]) gelungen nachzuweisen, daß das Wachstum sowie die Entwicklung der Froschlarven durch Verfütterung von Schilddrüsen- oder Thymussubstanz in sehr ausgesprochener Weise beeinflußt werden. Zu den gleichen Ergebnissen kommt auch B. Romeis[2]) auf Grund seiner sehr zahlreichen und systematisch durchgeführten Untersuchungen.

Diese von Gudernatsch eingeführte neue biologische Methode benutzten E. Abderhalden[3]) sowie R. H. Kahn[4]) zur Prüfung der Wirksamkeit der nicht-eiweißartigen Produkte der Schilddrüse, Thymus, Hypophyse und anderer Organe mit innerer Sekretion. Abderhalden unterwarf die einzelnen Organe dem kombinierten fermentativen Abbau mittels Pepsinsalzsäure, Pankreas- und Darmsaft. Die dabei erhaltenen wasserlöslichen Produkte, die sämtlich eine negative Biuretreaktion zeigten und bei denen durch Kochen mit Säuren entweder keine oder doch nur sehr geringfügige Zunahme des Aminstickstoffes zu erzielen war[5]), wurden dann an Kaulquappen von Rana es-

[1]) Gudernatsch, Arch. f. Entwicklungsmech. **35**, 457.

[2]) Romeis, Arch. f. Entwicklungsmech. **40**, 571 und **41**, 57; Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. **4**, 379 und **5**, 99.

[3]) E. Abderhalden, Arch. f. d. ges. Physiol. **162**, 99.

[4]) R. H. Kahn, Arch. f. d. ges. Physiol. **163**.

[5]) Über die Eigenschaften der verwendeten Substanzlösungen macht Abderhalden noch folgende Mitteilung: Die Ninhydrinreaktion war positiv. Mit Hilfe der bekannten Farbenreaktionen konnten Tyrosin, Tryptophan und Cystin nachgewiesen werden. 1 ccm der Thymuslösung

culenta, Rana temporaria, Pelobates fuscus und von Bufo vulgaris untersucht. Durch sehr zahlreiche Versuche konnte Abderhalden nachweisen, daß die bei der Verdauung der Schilddrüse, der Thymus usw. entstehenden abiureten Produkte ebenso auf das Wachstum und die Entwicklung der Kaulquappen wirken, wie die von Gudernatsch verfütterten Gesamtorgane. Damit dürfte bewiesen sein, daß diejenigen Bestandteile dieser innersekretorischen Organe, die das Wachstum und die Differenzierung der Kaulquappen in so ausgesprochener Weise beeinflussen, weder Eiweißkörper noch höhere Eiweißabbauprodukte sind. „Kommen Eiweißabkömmlinge als wirksame Stoffe in Frage, dann können es nur tiefere Abbaustufen von Proteinen oder bestimmte ihrer Bausteine sein.“ [1])

In einer gleichzeitig ausgeführten und unabhängigen Untersuchung konnte R. H. Kahn durch Verwendung von eiweißfreien Extrakten aus Schilddrüse oder Schilddrüsentabletten die gleiche typische Beeinflussung des Larvenwachstums sehen. Auch R. H. Kahn ist der Meinung, „daß die Schilddrüsenwirkung auf die Froschlarven an den Eiweißgehalt des Präparates durchaus nicht geknüpft ist.“

Die hier angeführten neueren Erfahrungen mit den eiweißfreien Produkten der Schilddrüse (sowie anderen Drüsen) sind zweifellos für die Theorie der Schilddrüsenwirkung, sowie für die Therapie von großer Wichtigkeit. Eine Lösung der Schilddrüsenfrage ist aber damit noch keineswegs gegeben. In erster Linie berechtigt nicht dazu die noch geringe Zahl der ausgeführten Untersuchungen. Meiner Meinung nach wird man aber durch die Annahme, die wirksamen Schilddrüsenstoffe seien einfach gebaute Stoffe, den Tatsachen viel mehr Rechnung tragen, als mit der Annahme, diese (oder dieser) Eiweißkörper stellen das wirksame Prinzip der Schilddrüse dar. Es ist überhaupt fraglich, ob die Wirkung nur an eine einzige Substanz geknüpft sei. Die widersprechenden Angaben, die man in der Literatur über die Wirkung von jodhaltigen und jodfreien, jodarmen und jodreichen, globulin- und peptonartigen Schilddrüsenstoffen usw. findet, würden eine solche Behauptung kaum unterstützen. Sind

enthielt 0,0008 g N; 1 ccm der Schilddrüsenlösung 0,0005 g N. Es ist leider nicht zu ersehen, ob die Schilddrüsenlösung auch Jod enthielt.

[1]) Abderhalden, l. c. S. 108.

doch außerdem z. B. aus der Hypophyse bereits 8 aminähnliche Stoffe isoliert, von denen nur 4 auf den Uterus typisch reagieren[1]). Auch bei der Nebenniere ist nicht bewiesen, daß das Adrenalin die einzige wirksame Substanz darstellt. Es sei noch bemerkt, daß die Annahme eines (oder mehrerer) einfach gebauter wirksamer Schilddrüsensubstanzen die Wirksamkeit der Schilddrüseneiweißstoffe in keiner Weise ausschließt, sondern im Gegenteil sehr gut erklären läßt. Die Schilddrüseneiweißstoffe würden in diesem Falle die Muttersubstanz dieser Produkte darstellen. Dafür würden auch die feststehenden therapeutischen Erfolge bei der Schilddrüsenzufuhr per os, als auch die oben erwähnten Verdauungsversuche von Abderhalden sprechen. Allerdings wird man dabei die nicht unwahrscheinliche Hypothese machen müssen, diese wirksamen Bestandteile entstehen auch aus dem Eiweiß im Zellstoffwechsel der Schilddrüse, ebenso wie das Adrenalin in der Nebenniere oder das Hypophysin in der Hypophyse. Damit wäre dann die Wirksamkeit der Organauszüge erklärt.

Methodik.

Als Versuchstiere dienten 2 Hündinnen und 1 Hund. An der Hündin I (ca. 3 Jahre alt) wurden sowohl bei Erhaltung der Schilddrüse, als auch nach der Thyreoidektomie Versuche ausgeführt. Hündin II (ebenfalls ca. 3 Jahre alt) wurde nur im normalen Zustande untersucht. Beim Hund III waren die Schilddrüsen operativ entfernt. Dieser Hund wurde nur einmal gebraucht, und zwar zur Kontrolle, ob nicht eventuell beim schilddrüsenlosen Tiere eine Steigerung der Stickstoffausscheidung während des Hungers eintritt. Mit Ausnahme des ersten Vorversuches wurden sämtliche andere Versuche am hungernden Tiere ausgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde nur der Eiweißstoffwechsel untersucht.

Die Tiere befanden sich während des Versuches in einem gewöhnlichen Stoffwechselkasten mit Glaswänden. Der emaillierte Boden war durchlöchert und herausnehmbar. Der im Käfig gelassene Harn floß in eine mit Trichter und Watte versehene Flasche ab. Nach dem Ausgießen des Harnes wurde

[1]) H. Führer, Zeitschr. f. d. ges. experim. Med. 1, 397.

die Flasche immer sorgfältig gewaschen und erst dann wieder unter den Käfig gestellt. Während der heißen Sommerzeit, wo die ammoniakalische Gärung des Harnes besonders zu befürchten war, kamen 1 bis 2 ccm konz. Salzsäure in die Flasche, sonst wurde Toluol zugegeben. Ich konnte übrigens einige Versuchsserien verzeichnen, in deren Verlauf die Harnflasche gar nicht zum Gebrauch kam, da nach kurzer Zeit die Hunde so dressiert wurden, daß sie ihren gesamten 24 stündigen Harn in eine untergehaltene Schale abgaben.

Da erfahrungsgemäß die Hunde während des Hungers das Wassertrinken vermeiden und daher sehr unregelmäßig den Harn ablassen, habe ich vom 1. Hungertage an den Tieren eine während des ganzen Versuches gleichbleibende Wassermenge per os mit der Sonde eingeführt und dadurch ein sehr regelmäßiges Urinieren erzielt.

Die Tiere wurden jeden Morgen zwischen 9 bis $9^1/_2$ Uhr ins Freie geführt, und nach kurzem Herumlaufen gaben sie den Harn ab. Der Harn wurde quantitativ in die bereitgehaltene Schale gesammelt. Bei den Hündinnen läßt sich auf diese Weise der Harn sehr gut auffangen. Nach der Harnentleerung wurden die Tiere gewogen.

Während der ganzen Versuchsdauer wurde darauf Wert gelegt, die Tiere unter möglichst physiologischen Bedingungen zu halten. Sie wurden 2-, oft aber auch 3 mal im Tag an der Kette im Freien herumgeführt, um ihnen die nötige Bewegung zu ermöglichen. Die Stickstoffbestimmung im Harn erfolgte nach der Methode von Kjeldahl, wobei alle zur Analyse gebrauchten Reagenzien öfters auf ihren N-Gehalt kontrolliert wurden. Vor jeder Stickstoffbestimmung wurde der Harn mit Hilfe der Sulfosalicylsäureprobe auf etwa vorhandenes Eiweiß untersucht. Ich möchte diese Prüfung auf Eiweiß bei allen Hungerstoffwechselversuchen sehr empfehlen. An einer ziemlich großen Reihe von Hungerversuchen an verschiedenen Hunden konnte ich mich überzeugen, daß während des Hungers nicht selten ganz leichte Albuminurien spontan auftreten, um nach 1 bis 2 Tagen vollkommen zu verschwinden. Waren geringe Eiweißmengen nachgewiesen, so wurde der Harn enteiweißt und das Filtrat für die Stickstoffbestimmung verwendet. Der Kot wurde mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, auf dem

Wasserbade getrocknet, gewogen und gepulvert. Ein abgewogener Teil kam dann zur Analyse. Die stickstoffhaltigen Bestandteile der Nahrung (Reis, Hundekuchen) sowie die verwendeten Schilddrüsenpräparate wurden ebenfalls analysiert.

Das Thyreoglandol (100%ig) stellt eine wasserklare Flüssigkeit vom spez. Gewichte 1,016 dar. Es ist nicht ganz frei von Jod. Sein Jodgehalt beträgt 0,0013%. Diese Zahl ist sehr gering, es ist aber doch auffallend, daß auch die nichteiweißhaltigen Auszüge aus der Drüse Jod enthalten.

Vorversuch vom 24. II. bis 13. III. 1916.

Die Prüfung einer Substanz auf ihre Stoffwechselwirkung setzt bekanntlich eine Grundbedingung voraus, nämlich, daß sich der zu prüfende Orgánismus in einem stationären genau bekannten Zustand befindet. Man erreicht dies auf zweierlei Weisen: 1. entweder bringt man das Tier durch passend gewählte und analysierte Nahrung in das sogenannte Stoffwechselgleichgewicht, wo der Organismus ebensoviel von dem betreffenden Element (Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphor usw.) ausscheidet, wie er erhält. Ist dieser Zustand erreicht, so wird mit der Zufuhr der fraglichen Substanz begonnen und festgestellt, ob die Stoffzersetzung im Organismus zu- oder abnimmt. Dieser Methodik bedienten sich auch B. Schöndorff[1]), Fr. Voit[2]) bei ihren Untersuchungen über den Einfluß der Schilddrüse auf den Eiweiß- und den Gasstoffwechsel; 2. oder aber man wählt den Hungerzustand, wo sich nach Ablauf der ersten Hungertage ebenfalls ein Zustand einstellt, in dem der Stoffwechsel regelmäßig verläuft.

Ich wollte zuerst den Einfluß des Thyreoglandols auf den Stoffwechsel nicht beim absoluten Hunger, sondern beim „Stickstoffhunger" studieren und suchte nun den Hund mit einer stickstoffarmen, aber fett- und kohlenhydratreichen Nahrung ins „Stickstoffminimumgleichgewicht" (Abnutzungsquote) zu bringen. Der Hund bekam täglich:

100 g Reis,
100 g Butter,
100 g Zucker.

[1]) B. Schöndorff, Arch. f. d. ges. Physiol. **67**, 395.
[2]) Fr. Voit, Zeitschr. f. Biol. **35**, 116.

Tabelle
Hündin I, normal.

Datum		Körpergewicht kg	Nahrung
24. II. 1916	1. Versuchstag	26,80	100 g Reis + 100 g Butter + 100 g Zucker + 2 g Salzmischung
25.	2. „	26,30	desgl.
26.	3. „	26,00	desgl.
27.	4. „	26,60	desgl.
28.	5. „	26,28	desgl.
29.	6. „	26,80	desgl.
1. III.	7. „	26,35	desgl.
2.	8. „	26,05	desgl.
3.	9. „	26,15	desgl.
4.–5.	10.–11. „	—	desgl.
6.	12. „	25,60	desgl.
7.	13. „	25,75	desgl.
8.	14. „	25,30	desgl.
9.	15. „	25,95	desgl.
10.	16. „	25,40	desgl.
11.	17. „	25,20	desgl.
12.	18. „	25,20	desgl.
13.	19. „	25,00	desgl.

Außerdem wurden der Nahrung 2 g eines Salzgemisches, bestehend aus NaCl, KH_2PO_4, $CaCO_3$, Fe_2O_3 zugesetzt. Der Caloriengehalt der Nahrung setzte sich zusammen:

aus 100 g Reis . . . . 357 Cal,
„ 100 g Butter . . . 790 „
„ 100 g Zucker . . . 410 „
total . . . 1557 Cal.

Zu Beginn des Versuchs wog das Tier 26,8 kg. Pro Kilogramm Körpergewicht und Tag erhielt der Hund 59,09 Cal. Sein dynamogener Bedarf war also vollständig gedeckt, da beim Hund nach den Berechnungen von Pflüger[1]) bei Ruhe und mittlerer Temperatur auf das Kilogramm Körpergewicht 55 Cal fallen. Trotzdem scheint die Nahrung aber unzureichend, da der Hund fortwährend im Gewicht abnimmt. Während der ersten 9 Tage

[1]) Pflüger, Arch. f. d. ges. Physiol. **52**, 77.

I.

Stickstoffarme Kost.

Zulage	Caloriengehalt der Nahrung pro Kilogramm Körpergewicht	N-Gehalt der Nahrung g	Harnmenge ccm	Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht ausgeschieden N g	Bemerkungen
keine	58,09	1,30	915	7,02	0,262	
„	59,20	1,30	1190	6,42	0,244	
„	59,88	1,30	925	5,24	0,201	
„	58,83	1,30	450	2,72	0,132 (Mittelwert)	Der Hund hat einen Teil des Harns retiniert.
„	59,24	1,30	955	5,46		Harn schwach eiweißhaltig; enteiweißt.
„	58,09	1,30	940	4,71	0,176	
Thyreoglandol, 3 Amp. à 1,1	59,20	1,30	940	3,80	0,144	Das Präparat wurde subcutan injiziert.
„ 4 „ à 1,1	59,77	1,30	880	3,74	0,143	
„ 4 „ à 1,1	59,55	1,30	625	3,08	0,102	
keine	—	—	—	—	—	
„	60,82	1,30	575	2,00	0,123	
„	60,46	1,30	745	2,58	0,101	
8 Tabletten à 0,162 g	61,55	1,34	750	2,27	0,089	Die angewandten Tabletten waren von Burroughs Wellcome & Co. (Tabloid Thyroid Gland).
12 „ à 0,162 g	60,00	1,37	790	2,23	0,086	
15 „ à 0,162 g	61,30	1,38	945	2,96	0,116	
12 „ à 0,162 g	61,77	1,37	645	2,69	0,107	
12 „ à 0,162 g	61,77	1,37	750	3,09	0,123	
12 „ à 0,162 g	62,28	1,37	940	3,07	0,123	

verlor er 650 g. Dieser Verlust an Körpergewicht macht sich in den folgenden Versuchstagen noch deutlicher bemerkbar, wobei allerdings der Einfluß der verfütterten Schilddrüsentabletten berücksichtigt werden muß.

N-Analyse der Tabloid Thyroid Gland von Burroughs Wellcome & Co.: 3 Tabletten à 0,162 g ($2^1/_2$ g) verbrauchten nach Kjeldahl 10,82 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. Jede Tablette enthält 0,0055 g N.

N-Analyse des Reises: 1,92 g Reis verbrauchten 17,0 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4; 2,013 g Reis verbrauchten 19,45 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. N-Gehalt des Reises = 1,30 % (Mittel aus beiden Bestimmungen).

Der Hund hat im Verlaufe der 19 Versuchstage 63,08 g Stickstoff durch den Harn ausgeschieden, seine Stickstoffeinnahmen während dieser Zeit betrugen 25,10 g N. Das Stickstoffminimumgleichgewicht hat sich nach 2 wöchentlicher Fütte-

rung eingestellt. Die sogenannte Abnutzungsquote des Hundes würde demnach 2,25 g N pro 24 Stunden darstellen, oder 0,088 g N pro Kilogramm Körpergewicht. Die Injektionen von Thyreoglandol sowie die Eingabe der Tabletten hatten einen orientierenden Charakter und bezweckten nur die Feststellung der Dosierung und der Verträglichkeit des Präparates. Eine Wirkung auf die Stickstoffausscheidung konnte das Thyreoglandol schon aus dem Grunde nicht haben, weil am 7. Versuchstage, wo mit den Einspritzungen begonnen wurde, das Tier sich noch nicht in der Stickstoffminimumphase befand: am Tage vor der Injektion schied der Hund 4,71 g N aus, also fast das Doppelte von seiner wahren Abnutzungsquote (2,25 g). Außerdem waren ja die injizierten Mengen (3 bis 4 ccm) viel zu gering, um den Stickstoffstoffwechsel zu beeinflussen.

Ich konnte aber feststellen, daß die Injektion des Präparates keine toxischen Erscheinungen hervorruft und daß mit der Dosierung viel höher gegangen werden darf. Von der subcutanen Eingabe mußte ich aber in den weiteren Versuchen absehen, da die Injektion der relativ geringen Mengen von 3 bis 4 ccm heftige Schmerzen hervorrief. Die Injektion konnte in keinem Falle an einer einzigen Stelle ausgeführt werden, da der sonst sehr ruhige Hund sich der Fortsetzung der Einspritzung mit aller Kraft widersetzte.

Dieser Vorversuch zeigte außerdem, daß es sich beim fraglichen Hund um ein Tier handelt, das auch im normalen Zustande, d. h. bei Erhaltung der Schilddrüsen, auf die Zufuhr von Schilddrüsensubstanz mit einer Steigerung der Stickstoffausscheidung reagiert. Bereits am 3. Tage der Fütterung mit den Tabletten macht sich die Stickstoffsteigerung bemerkbar, indem der Harnstickstoff von 2,25 (im Mittel aus den 2 letzten Vortagen) auf 2,96 g heraufgeht. Auf dieser Höhe hält sich die Stickstoffzersetzung einige Tage, wobei am Tage nach der ersten Stickstoffsteigerung ein kleiner Abfall des Stickstoffgehaltes des Harnes eintritt — alles Erscheinungen, die ich nachfolgend sowohl nach Thyreoglandol, sowie nach Tabletteneingabe wiederfinden konnte. Die durch die Schilddrüsentabletten hervorgerufene Stickstoffsteigerung wird noch deutlicher, wenn man die Stickstoffausscheidung pro Kilogramm Körpergewicht berücksichtigt. Es braucht nicht her-

vorgehoben zu werden, daß diese Art der Berechnung die richtigere ist, da das Tier fortwährend (besonders aber bei Schilddrüsenzufuhr) im Gewicht abnimmt. Hier erhöht sich die N-Ausscheidung von 0,089 bis 0,086 g auf 0,117 g pro Kilogramm (Mittel aus 4 Tagen). Diese Steigerung beträgt, in Prozenten berechnet, 32% (Mittel aus 4 Tagen), die maximale Steigerung in den letzten 2 Tagen (0,123 g pro Kilogramm) beträgt 40%.

Es geht aus dieser Versuchsserie hervor, daß die Zufuhr von Schilddrüsensubstanz beim Hund nicht nur im Hunger oder im Falle des Stickstoffgleichgewichts bei reicher Eiweißnahrung[1]), sondern auch im Zustande des Stickstoffminimums eine Erhöhung der Eiweißzersetzung bedingt.

Diese Tatsache würde sich schwer mit der Ansicht von Schöndorff vereinigen lassen, daß es sich bei der Stickstoffsteigerung nach Schilddrüseneingabe zuerst um eine vermehrte Ausspülung der Extraktivstoffe aus dem Organismus handle. Mein Hund befindet sich im Stickstoffminimum, seine Stickstoffausscheidung beträgt jetzt nur $^1/_3$ der ursprünglichen (2,25 g gegen 7,02 g). Die zur Verfügung stehenden Extraktivstoffe dürften bereits angegriffen sein, da der Organismus aller Wahrscheinlichkeit nach sämtliche verfügbare Stickstoffquellen zur Deckung des bestehenden Stickstoffbedarfs heranzieht. Man müßte in diesem Falle an eine spezifische Verwandtschaft der Schilddrüse zu den Extraktivstoffen des Körpers denken. Diese läßt sich aber kaum beweisen. Leider kann überhaupt die höchst wichtige Frage, auf welchem Wege die Schilddrüse die gesteigerte Stickstoffausscheidung herbeiführt, vorläufig nicht beantwortet werden, da uns der Zellstoffwechsel, auf den es doch dabei ankommt, vollkommen unbekannt ist. Wir haben bis jetzt auch keine Methoden, um in unseren Ausscheidungen den Stickstoff aus der Eiweißzersetzung vom „Nichteiweißstickstoff" zu unterscheiden und zu trennen.

Nach all den während dieses Vorversuches gewonnenen Erfahrungen wollte ich zur Ausführung des Hauptversuches schreiten und suchte nach einer 2 monatlichen Pause, den Hund wieder auf das Stickstoffminimum zu bringen. Dabei trat aber

---

[1]) B. Schöndorff, Fr. Voit u. a.

die so häufig bei Stoffwechselversuchen zu beobachtende Komplikation ein, nämlich die Verweigerung der dargereichten Nahrung. Sämtliche Versuche über eine Korrektur des Geschmacks durch Zusatz von Fleischextrakt, Fleischstückchen führten nicht zum Ziel: der Hund hungerte 2 Tage, trotzdem die Reisnahrung vor ihm stand. Ich war daher gezwungen, die Versuche mit der Beeinflussung des Stoffwechsels beim Stickstoffminimum aufzugeben, und ich ging zu den Hungerversuchen über. Auch hier schien es mir zweckmäßig, in einem vorläufigen Versuch festzustellen, ob erstens nicht im Laufe einer längeren Hungerperiode normal eine Stickstoffsteigerung beim Hund eintritt; zweitens, sollte der Hungerversuch über den Hungereiweißumsatz des Tieres Aufschluß geben. Näheres über diesen Versuch enthält die nachfolgende Tabelle.

Tabelle II.

Hündin I (vor der Schilddrüsenentfernung). Hunger.

Datum		Körpergewicht kg	Wasser eingegeben ccm	Harnmenge ccm	Gesamt-N im Harn	Bemerkungen
10. V. 1916	1. Hungertag	30,95	440	710	—	
11.	2. „	30,05	480	355	4,64	
12.	3. „	28,75	700	315	5,85	
13.	4. „	28,40	350	kein Harn	—	} Mittel pro die 4.26.
14.	5. „	28,00	200	350	8,53	
15.	200 g Reis + Fett . . .	27,72	400	480	4,11	Zugeführt 2 g N.
16.	100 g Reis + 100 g Butter + 100 g Zucker . . .	28,37	—	565	2,73	Zugeführt 1 g N.
17.	Desgl.	28,75	125	870	2,95	Zugeführt 1 g N. Während des Hungers ausgeschieden durch den Harn 23,13 g N.

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß normalerweise bei diesem Tier im Hungerzustand keine Steigerung der Stickstoffausscheidung eintritt. Diese wäre auch schwer zu erwarten. Der Hund wurde im Laufe der 2 Monate, vom 13. III. bis 10. V. mit einer eiweiß- und fettreichen Nahrung gefüttert, er nahm auch während dieser Zeit um 5,95 kg zu und hatte sich demnach ein größeres Fettdepot angelegt. Eine Stickstoffsteigerung während des Hungerns tritt gewöhnlich erst nach einer längeren Periode (prämortale Stickstoffsteigerung), nicht

aber in relativ kurz dauernden Versuchen ein. Außerdem zeigen nur fettarme und junge Hunde diese Erscheinung im Gegensatz zu älteren Tieren, bei denen bis zum Hungertod die Stickstoffausscheidung im Harn allmählich abnimmt[1]).

Die Tabelle zeigt auch, daß der Hund im Laufe des Hungers immer weniger Wasser zu sich nimmt und die Urinabgabe unregelmäßig wird. Diese altbekannten Erfahrungen veranlaßten mich auch, in meinen weiteren Versuchen den Tieren täglich eine bestimmte Wassermenge mit der Schlundsonde einzuführen. Erwähnenswert ist auch die Tatsache, daß mit dem Beginn der Nahrungszufuhr die Stickstoffausscheidung nicht zunimmt, sondern im Gegenteil abnimmt. Am letzten Hungertage schied der Hund 4,26 g N aus, am 2. Eßtag nach Zufuhr von insgesamt 3 g Stickstoff findet man nur 2,73 g N im Harn. Das Tier sucht also den Stickstoff zurückzuhalten — eine Erscheinung, die man in den ersten Tagen nach einer Hungerperiode häufig beobachtet.

Tabelle III.

Hund III, thyroidektomiert. Hunger.

Datum		Körpergewicht kg	Wasser eingegeben ccm	Harnmenge ccm	Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht ausgeschieden N g
22. X. 1916	Letzter Eßtag . . .	10,20	400	790	3,63	0,356
23.	1. Hungertag . . .	9,90	400	595	1,91	0,194
24.	2. „ . . .	9,72	400	490	1,71	0,177
25.	3. „ . . .	9,52	400	465	2,30	0,241
26.	4. „ . . .	9,37	400	405	2,27	0,242
27.	5. „ . . .	9,27	400	440	2,17	0,234
28.	6. „ . . .	9,20	400	390	1,59	0,173
29.	7. „ . . .	8,77	400	425	1,76	0,196

Bemerkung: Nur am 28. X. waren Spuren von Eiweiß im Harn nachzuweisen, sonst war der Harn eiweiß- und zuckerfrei. Am 28. X. wurde die Analyse an dem mit 2%iger Essigsäure unter Kochsalzzusatz enteiweißten Harn ausgeführt.

Ich hatte Gelegenheit, auch einen schilddrüsenlosen Hund 7 Tage lang hungern zu lassen. Der Hund wurde vor-

[1]) C. Voit, Hermanns Handb. d. Physiol. 6, I, 94.

her ebenso wie meine Hündin ernährt. Wie die Tabelle III zeigt, tritt normalerweise auch beim thyroidektomierten Tier im Laufe des Hungers keine Stickstoffsteigerung ein.

Periode vom 3. bis 12. VI.

Es folgte nun nach einer ca. 3wöchentlichen Pause eine Hungerperiode, in der das Tier Schilddrüsentabletten von Burroughs Wellcome & Co. erhielt. Dem Versuch ging eine kurze Fütterungsperiode voran. Vom 25. bis 29. V. erhält der Hund täglich ca. 1 kg Hundekuchen, vom 29. V. bis 3. VI. wieder täglich 100 g Butter + 100 g Reis (abgekocht) + 100 g Zucker + 2 g der Salzmischung. Diese kurze Vorfütterung mit einer stickstoffarmen Nahrung bezweckte, die Stickstoffausscheidung im Harn noch vor dem Hungern etwas herabzusetzen, damit sich der sogenannte Grundumsatz des Tieres während des Hungerns rascher einstellt.

Wie die Tabelle IV zeigt, trat unter der Wirkung der Schilddrüsentabletten eine, man möchte sagen, enorme Stickstoffsteigerung ein; von 2,58 und 2,02 g N in den beiden Vortagen auf 5,52 und 4,39 g N. Pro Kilogramm Körpergewicht berechnet, beträgt die Stickstoffsteigerung 123 und 82 %. Die Stickstoffsteigerung ist von einer verstärkten Diurese begleitet, indem die Harnmenge in diesen Tagen 710 und 570 ccm gegen rund 400 ccm in den vorigen Tagen beträgt. Die vermehrte Harnausscheidung infolge Schilddrüseneingabe ist beim Hund nicht immer, wohl aber ziemlich regelmäßig beim Menschen zu sehen. Nach Aussetzen der Tabletteneingabe und nach Zufuhr von Nahrung in Form von Butter, Zucker und Reis erfolgt, wie im vorigen Fall, eine Abnahme des N-Gehaltes des Harnes; die negative Stickstoffbilanz des Harnes sinkt von 5,52 und 4,39 g auf 2,35 und 1,73 g.

N-Analyse der Tabloid Thyroid Gland von Burroughs Wellcome & Co.: 2 Tabletten à 0,324 g (5 g) nach Kjeldahl auf ihren N-Gehalt analysiert. Verbraucht 13,85 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. Jede Tablette enthält 0,01 g N (Schöndorff fand 0,0111 g).

Periode vom 2. bis 12. VII.

Nachdem nun der letzte Hungerversuch ergeben hat, daß der Hungereiweißumsatz des Tieres durch vollwertige Schild-

drüsentabletten in mächtiger Weise gesteigert wird, schritt ich zum Versuche mit Thyreoglandol. Auch in diesem Fall wurde der Hund vom 24. VI. an auf die schon früher gebrauchte stickstoffarme Nahrung gesetzt. Während der letzten 9 Tage vor Beginn des Versuchs (vom 24. VI. bis 2. VII.) erhielt das Tier täglich:

100 g	Zucker . . .	410 Cal
100 g	Reis	357 „
150 g	Butter . . .	1185 „
	total . . .	1952 Cal.

Außerdem bekam es täglich 2 g einer Salzmischung, bestehend aus 50 Teilen NaCl, 10 Teilen $CaCO_3$, 5 Teilen KH_2PO_4 und 4 Teilen Fe_2O_3.

Am 24. VI. wog der Hund 25,8 kg, er bekam damit pro Kilogramm 75,6 Cal — eine Ernährung, die, energetisch betrachtet, vollkommen ausreichend ist. Am 3. VII. begann der Hungerversuch. Vom 3. Hungertage an bekommt das Tier mit der täglichen Menge von 300 ccm Wasser 15 ccm Thyreoglandol [das Thyreoglandol wurde mit dem Wasser gemischt und die ganze Flüssigkeitsmenge (300 ccm) mit der Schlundsonde eingegeben].

Auch hier wie beim Versuch mit den Schilddrüsentabletten reagiert das Tier zuerst nicht auf die Zufuhr des Schilddrüsenpräparates. Erst am 6. Hungertage, nach 4maliger Eingabe des Thyreoglandols, tritt (genau wie beim Versuch mit Schilddrüsentabletten) eine sehr hohe Steigerung in der Stickstoffausscheidung im Harn ein. An diesem Tage findet man im Harn eine Stickstoffmenge, die, pro Kilogramm Körpergewicht berechnet und mit dem gleichen Wert der 2 ersten Hungertage verglichen, eine Erhöhung von 128% bedeutet. Am folgenden Tage ist die N-Ausscheidung ebenfalls noch sehr bedeutend erhöht, 4,13 g N, die prozentische Stickstoffsteigerung beträgt noch 80%; ungefähr das gleiche Bild zeigt auch der letzte, 8. Hungertag, wo bei einer Stickstoffausscheidung von 3,96 g die prozentische N-Steigerung 64% beträgt. Der vermehrten Stickstoffsteigerung geht eine verstärkte Diurese parallel: während in den früheren Tagen die Harnmenge zwischen 300 und 400 ccm schwankte, steigt sie nun auf 635, 600 und 500 ccm an. Auf Aussetzen des Präparates und Zufuhr von Nahrung

Tabelle

Hündin I vor der Schilddrüsen-

Datum		Körpergewicht kg	Wasser eingegeben ccm	Schilddrüsentabletten à 0,324 g (5 g)
3. VI. 1916	Letzter Eßtag	26,75	300	keine
4.	1. Hungertag	26,35	300	„
5.	2. „	26,10	300	„
6.	3. „	25,80	300	20
7.	4. „	25,60	300	20
8.	5. „	25,20	300	20
9.	6. „	25,20	200	20
10.	7. „	24,65	300	20
11.	100 g Reis + 100 g Butter + 100 g Zucker	24,35	—	keine
12.	Desgl	24,95	—	„

sinkt der Stickstoffgehalt des Harnes. Eine Nachwirkung der Schilddrüsenzufuhr konnte ich ebenso wie B. Schöndorff nicht feststellen.

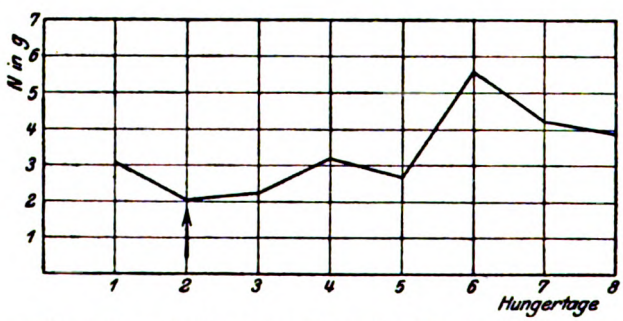


Fig. 1. Stickstoffausscheidung im Harn bei Hündin I vor der Schilddrüsenentfernung. Hunger. Bei ↑ beginnt die tägliche Zufuhr von Thyreoglandol.

Der Stickstoffgehalt des Kotes wurde in diesen Versuchen nicht bestimmt, und zwar aus folgendem Grunde: ich hatte ganze Hungerperioden, wo am 2., manchmal am 3. Hungertage eine Kotentleerung eintrat, am Schlusse des Hungerversuches Kot nicht zu erhalten war. Die folgende Defäkation trat ge-

IV.

entfernung. Hunger.

N eingeführt g	Harnmenge ccm	Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht ausgeschieden N g	Negative N-Bilanz des Harnes	N-Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 2 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
1,30	710	2,57	0,0961	— 1,27	—	
0,00	420	2,92	0,111	— 2,92	—	
0,00	225	2,21	0,085	— 2,21	—	
0,20	420	2,77	0,107	— 2,57	—	
0,20	400	2,58	0,100	— 2,38	—	
0,20	450	2,02	0,080	— 1,82	—	
0,20	710	5,52	0,219	— 5,32	124	Doppelanalyse.
0,20	570	4,39	0,178	— 4,19	82	
1,30	650	3,35	0,143	— 2,05	—	
1,30	560	2,73	0,110	— 1,43	—	Während der ganzen Versuchsperiode war der Harn eiweiß- und zuckerfrei. — Während der 7 Hungertage ausgeschieden 22,41 g N durch den Harn

wöhnlich am 1. oder 2. Eßtage ein. Unter diesen Umständen hätte die Stickstoffbestimmung im Kot wenig Wert, da der uns interessierende Hungerkot nicht abzutrennen war. Nur in einem zuletzt angeführten Versuch habe ich eine Kotanalyse ausgeführt. Das Fehlen des Kotstickstoffes, was ja eventuell zu bedauern ist, trübt aber die Deutlichkeit der Versuche in keiner Weise. Die Kotanalysen werden ja so gemacht, daß der Stickstoffgehalt des Kotes bestimmt und die gefundene N-Zahl gleichmäßig auf alle „kotlosen“ Tage verteilt wird. Wenn es mir nach einer 4- bis 6tägigen Pause, z. B. am letzten Hungertage, gelingen sollte, Kot zu erhalten, so müßte ich den ermittelten Kotstickstoff durch 4 oder 6 dividieren und die gefundene Zahl zum betreffenden Stickstoffwert des Harnes addieren. Dadurch würde die absolute tägliche N-Bilanz etwas höher ausfallen, die relative Stickstoffsteigerung im Vergleiche mit den Tagen ohne Schilddrüsensubstanzzufuhr (auf die es doch in meinen Versuchen hauptsächlich ankommt) würde gleich bleiben.

Der Hungerkotstickstoff betrug bei diesem Hund im Versuch vom 22. bis 30. X. 0,144 g pro die.

N-Analyse des Thyreoglandols: 5 ccm Thyreoglandol

Tabelle

Hündin I vor der Schilddrüsen-

Datum		Körpergewicht kg	Wasser eingegeben ccm	Thyreoglandol-Ampullen à 1,1 ccm
2. VII. 1916	Letzter Eßtag	24,80	—	kein
3.	1. Hungertag	24,65	300	„
4.	2. „	24,00	300	„
5.	3. „	23,85	300	15
6.	4. „	23,50	300	15
7.	5. „	23,50	300	15
8.	6. „	22,80	300	15
9.	7. „	22,75	300	15
10.	8. „	22,50	300	15
11.	1. Eßtag	22,75	—	kein
12.	2. „ (100 g Hundekuchen mit 3,03 g N + Butter)	22,60	—	„

verbrauchten 1,60 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. Kontrollanalyse: 1,60 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. 1 ccm Thyreoglandol enthält 0,448 mg N.

N-Analyse des Hundekuchens: 0,8756 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 18,95 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. N = 3,03%.

Am 22. VII. 1916 werden dem Hunde unter Morphium-Äthernarkose die beiden Schilddrüsen vollkommen entfernt[1]). Die Parathyreoidea liegen beiderseits ziemlich hoch über den Schilddrüsen. Sie werden unverletzt isoliert und in die Schilddrüsenkapsel eingenäht.

Am 23. VII. ist nichts Auffallendes zu beobachten. Kot flüssig, schwach bluthaltig. Der Harn ist eiweißfrei.

Am 3. Tage nach der Operation bekam der Hund gegen 10^{30} vorm. die ersten Anzeichen eines Tetanieanfalles. Die Atmung wird immer beschleunigter, der Mund ist offen, Zunge ausgestreckt. Temperatur im Rectum 39,5°. Nach kurzer Zeit treten geringe Anfälle auf: die Beine werden steif, das Tier fällt leicht um.

[1]) Die Operation wurde von Dr. H. Matti, Privatdozent für Chirurgie, ausgeführt, wofür ich ihm auch an dieser Stelle meinen wärmsten Dank ausspreche.

V.

entfernung. Hunger.

N eingeführt g	Harnmenge ccm	Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht ausgeschieden N g	Negative N-Bilanz des Harnes	N-Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 2 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
1,30	420	2,62	0,105	— 1,32	—	
0,0	575	3,06	0,124	— 3,06	—	
0,0	430	2,10	0,0875	— 2,10	—	
0,0068	280	2,30	0,0964	— 2,30	—	
0,0068	460	3,25	0,138	— 3,25	—	
0,0068	360	2,79	0,119	— 2,79	—	Nur am 7. Juli waren Spuren von Eiweiß im Harn nachzuweisen.
0,0068	635	5,52	0,242	— 5,52	128	Der Harn wurde enteiweißt
0,0068	600	4,30	0,191	— 4,30	80	und dann analysiert. An allen übrigen Tagen war der Harn eiweißfrei.
0,0068	500	3,96	0,174	— 3,96	64	Gesamt-N-Ausscheidung durch
0,50	310	3,62	0,159	— 3,12	—	den Harn im Hunger = 27,28 g.
3,03	160	2,97	0,131	+ 0,06	—	

10^{50} vorm. Das Tier erhält 5 ccm Thyreoglandol subcutan. Da keine merkliche Besserung eintritt, so werden um 11^{00} vorm. 15 Tabloid Thyroid gland à 0,162 g, in Wasser suspendiert, mit der Schlundsonde eingegeben.

20 Minuten nach der Eingabe bessert sich der Zustand des Tieres, die Atmung wird ruhiger, die Steifheit der Beine verschwindet. Der Hund liegt noch erschöpft einige Stunden auf dem Boden, erholt sich aber ganz und nimmt am Nachmittag Nahrung auf.

Das war der einzige Anfall, den ich während der ganzen Zeit bei diesem Hund gesehen habe.

Am 25., 26., 27. und 28. VII. erscheint das Tier vollkommen normal und munter, der Harn ist frei von Eiweiß und Zucker, die Nahrung wird restlos gefressen.

Am 29. VII. beginnt die Vorfütterung, und zwar ebenso wie in den früheren Versuchen mit einer eiweißarmen Nahrung. Am 29., 30. und 31. VII. erhält der Hund täglich 150 g Rindfleisch und 75 g Fett.

Am 1. VIII. beginnt der zweite Versuch mit Thyreoglandol, diesmal am schilddrüsenlosen Hund. Nach einer 3tägigen Normal-

hungerperiode erhält der Hund täglich zuerst 15 ccm, dann 17 ccm und schließlich 20 ccm Thyreoglandol per os.

Auffallend bei diesem Versuch sind die geringen Stickstoffwerte im Harn vom 3., 4., 5. Hungertage, in denen gewöhnlich der Grundumsatz zum Vorschein kommt. In den früheren zwei Hungerperioden (vgl. Tabelle IV und V) betrug die Stickstoffausscheidung am 3., 4. und 5. Hungertage:

2,77 g, 2,58 g, 2,02 g;
2,30 g, 3,25 g, 2,79 g;

im vorliegenden Fall:

2,09 g, 1,85 g, 1,48 g,

trotzdem die Vorernährung in diesem Versuch stickstoffreicher war als in früheren Versuchen. Mit 100 g Reis, 100 g Zucker und 100 g Butter bekam dort das Tier höchstens 1,3 bis 1,4 g N, mit 150 g Rindfleisch hier ca. 5 g N pro Tag.

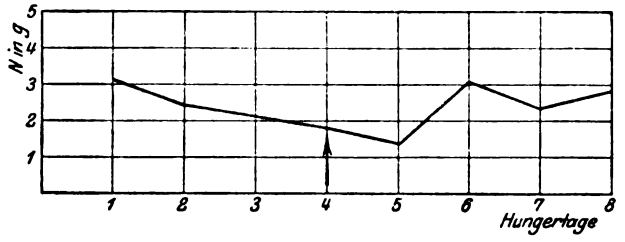


Fig. 2. Stickstoffausscheidung im Harn bei Hündin I nach der Schilddrüsenentfernung. Hunger. Bei ↑ beginnt die tägliche Zufuhr von Thyreoglandol.

Dem gesteigerten Eiweißzerfall unter dem Einfluß des Thyreoglandols entspricht ein erhöhter Gewichtsverlust: in den 3 Tagen vor dem Eintritt der Stickstoffsteigerung verlor das Tier regelmäßig 100 g Körpersubstanz pro die, dann aber 250 und 300 g. Auch die Diurese ist deutlich erhöht. Die eingetretene Stickstoffsteigerung beträgt am 6. Hungertage 73 %. Sie fällt am nächsten Tage auf die Hälfte und steigt dann wieder, indem sie am 8. Hungertage 61 % ausmacht. Insgesamt hat der Hund während dieser Hungerperiode 19,25 g Stickstoff durch den Harn zur Ausscheidung gebracht. Nun enthält nach Pflüger[1]) das magere Hundefleisch 3,3 % Stickstoff. Die ausgeschiedenen

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 52, 56.

19,25 g N würden einer Zersetzung von 583,3 g Körpereiweiß entsprechen. Im Laufe der 8 Hungertage hat aber der Hund 1600 g verloren. Neben diesen 583,3 g Eiweiß wurden damit 1017 g stickstofffreier Substanz (hauptsächlich Fett) zersetzt.

Periode vom 30. IX. bis 6. X.

Um nun auch am schilddrüsenlosen Tier einen Vergleich zwischen Thyreoglandol und Schilddrüsentabletten machen zu können, habe ich in einer neuen Hungerperiode eine Fütterung mit Schilddrüsentabletten unternommen. Während dieser 2 Monate nach der Operation haben sich die Symptome des Fehlens der Schilddrüse sehr deutlich ausgebildet. Der Hund verliert massenhaft Haare, er zeigt auch ein Zittern in den hinteren Extremitäten, springt nicht selbst in den Käfig, was er vor der Operation mit Leichtigkeit machte. Er sieht auch sonst apathisch aus und ist ziemlich unbeweglich. Der Harn ist klar, frei von Zucker und Eiweiß. 2 Wochen vor Beginn des Versuches erhält der Hund täglich Zulagen von Fett und Zucker zu dem Normalfutter. Am Schlusse des letzten Hungerversuches wog der Hund 21,25 kg, am 30. IX. beträgt sein Gewicht 25,12 kg, er hat somit rund um 4 kg zugenommen. Die Versuchsanordnung blieb auch hier die gleiche: zuerst eine Normalhungerperiode von 3 Tagen und dann Zufuhr von Tabletten.

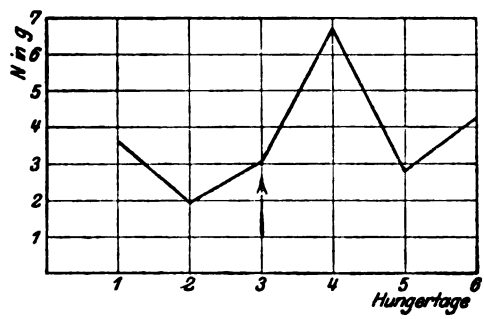


Fig. 3. Stickstoffausscheidung im Harn bei Hündin I nach der Schilddrüsenentfernung. Hunger. Bei ↑ beginnt die Zufuhr von Tabloid Thyroid Gland à 0,324 g von Burroughs Wellcome.

Dieser Versuch zeigt einige Eigentümlichkeiten, die nicht etwa den Gesamteffekt der Tablettenwirkung, sondern einige Einzelheiten betreffen. Erstens trat die Stickstoffsteigerung im

Tabelle

Hündin I nach der Schilddrüsen-

Datum		Körpergewicht kg	Wasser eingegeben ccm	Thyreoglandol ccm	N eingeführt g	Harnmenge ccm
31. VII. 1916	Letzter Eßtag	23,15	—	kein	—	125
1. VIII.	1. Hungertag	22,85	500	„	0,0	420
2.	2. „	22,50	300	„	0,0	[1])
3.	3. „	22,20	500	„	0,0	415
4.	4. „	22,10	500	15	0,0068	340
5.	5. „	22,00	500	15	0,0068	385
6.	6. „	21,75	500	17	0,0077	560
7.	7. „	21,55	500	17	0,0077	475
8.	8. „	21,25	550	20	0,0090	560

Tabelle

Hündin I, nach der Schild-

Datum		Körpergewicht g	Wasser eingegeben ccm	Schilddrüsentabletten à 0,324 g	N eingeführt	Harnmenge ccm
30. IX. 1916	Letzter Eßtag	25,12	—	keine	—	1630
1. X.	1. Hungertag	24,40	400	„	0,0	695
2.	2. „	23,80	400	„	0,0	405
3.	3. „	23,57	400	„	0,0	350
4.	4. „	23,25	400	20	0,20	410
5.	5. „	23,00	400	20	0,20	250
6.	6. „	22,62	400	20	0,20	395

[1]) 175 ccm Harn wurden, wie immer, in der daruntergehaltenen Schale beim Herumführen des Hundes gewonnen. Der Hund hat aber außerdem im Käfig uriniert. Durch eine ungeschickte Bewegung kippte der Hund die ihm im Käfig vorgestellte Schale mit Wasser um, so daß in der Harnflasche unter dem Käfig 665 ccm Flüssigkeit vorhanden waren. In den 175 ccm wurden 1,92 g N, in dem verdünnten Harn 0,56 g N, total 2,48 g N gefunden.

VI.

entfernung. Hunger.

Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht N ausgeschieden g	Negative N-Bilanz des Harnes	N-Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 3 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
3,68	0,1590	—	—	
3,11	0,1361	— 3,11	—	
2,48	0,1102	— 2,48	—	
2,09	0,0941	— 2,09	—	
1,85	0,0837	— 1,85	—	
1,48	0,0673	— 1,48	—	
3,076	**0,1414**	**— 3,076**	73	
2,37	**0,1100**	**— 2,37**	35	Doppelanalyse.
2,80	**0,1318**	**— 2,80**	61	Der Harn wurde täglich auf Eiweiß geprüft. Kein Eiweiß. Insgesamt während des Hungers durch den Harn ausgeschieden 19,25 g N.

VII.

drüsenentfernung. Hunger.

Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht N ausgeschieden g	Negative N-Bilanz des Harnes	Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 3 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
6,37	0,254	—	—	
3,61	0,148	— 3,61	—	
1,99	0,084	— 1,99	—	
3,14	0,133	— 3,14	—	Doppelanalyse.
6,72	**0,289**	**— 6,52**	137	Doppelanalyse.
2,76	**0,119**	**— 2,56**	0,0	
4,33	**0,191**	**— 4,13**	58	Während des Hungers kein Eiweiß und kein Zucker im Harn

Harn unmittelbar nach der Eingabe der Schilddrüsensubstanz ein, während sich in allen früheren Versuchen der Einfluß des Präparates erst nach 3- bis 4maliger Zufuhr zeigte. Auf die sehr hohe Stickstoffsteigerung von 3,14 g N im Vortage auf 6,72 g N am Tage der Tabletteneinnahme folgt ein Tag, in dem trotz der Schilddrüseneingabe gar keine Erhöhung des

Tabelle

Hündin I nach der Schild-

Datum		Körpergewicht g	Wasser eingegeben ccm	Thyreoglandol ccm	N eingeführt	Harnmenge ccm	Gesamt-N des Harnes
22. X. 1916	Letzter Eßtag	24,65	—	kein	—	1360	5,79
23.	1. Hungertag	24,45	400	„	0,0	670	3,44
24.	2. „	23,81	400	„	0,0	240	1,39
25.	3. „	23,35	400	„	0,0	320	3,34
26.	4. „	23,00	400	„	0,0	350	3,64
27.	5. „	22,82	400	20	0,011	335	3,80
28.	6. „	22,68	400	20	0,011	325	3,97
29.	7. „	22,60	400	20	0,011	390	3,39
30.	8. „	22,40	400	20	0,011	360	4,36

Harnstickstoffes zu finden ist. Am 6. Hungertage, wo der Hund immer noch Tabletten bekommt, tritt wieder eine N-Steigerung ein, die, mit den Normalhungertagen verglichen, 58% beträgt.

Es fehlte außerdem in diesem Versuch die Vermehrung der Diurese, die ausgeschiedene Harnmenge blieb die ganze Zeit, von einigen Schwankungen abgesehen, auf ungefähr der gleichen Höhe. Während dieser 6tägigen Hungerperiode hat der Hund 22,55 g N im Harn ausgeschieden, 3,3 g mehr als während des letzten 8tägigen Hungerns. Dies kommt erstens daher, daß schon während der 3tägigen Normalhungerperiode der Hund diesmal 1,14 g N mehr ausgeschieden hat:

vom 1. bis 3. X. 8,74 g,
„ 1. „ 3. VIII. 7,68 g.

Zweitens, war aber die Stickstoffsteigerung in absoluten Zahlen ausgedrückt höher (relativ im Vergleich mit dem letzten Tag vor dem Eintritt der N-Steigerung war in beiden Fällen die Wirkung ziemlich die gleiche). Was den allgemeinen Zustand des Hundes betrifft, so war der günstige Einfluß der Tabletten sehr deutlich: Der Hund ist trotz des Hungers viel lebhafter geworden, er springt ohne fremde Hilfe vom Käfig ab, auch das Zittern in den hinteren Beinen ist verschwunden.

VIII.

drüsenentfernung. Hunger.

Gesamt-N des Kotes	Pro Kilogramm Körpergewicht N ausgeschieden g	Negative N-Bilanz des Harnes	Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 3 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
—	0,237	—	—	Kot mit Carmin abgegrenzt.
—	0,140	—	—	Kot, rot gefärbt.
0,144	0,0642	— 1,53	—	
0,144	0,149	— 3,48	—	Doppelanalyse.
0,144	0,164	— 3,78	—	
0,144	0,172	— 3,94	33	
0,144	0,180	— 4,11	40	
0,144	0,156	— 3,53	22	
0,144	0,201	— 4,50	55	Kotentleerung.— Der Harn wurde täglich auf Eiweiß und Zucker kontrolliert; die Proben waren sämtlich negativ.

Periode vom 22. bis 30. X.

Von einer speziellen Vorernährung wurde diesmal abgesehen. Das Tier bekam vor dem Versuch eine reichliche Eiweißnahrung mit großen Zulagen von Fett und Zucker. Seit dem letzten Hungertag hat der Hund zu Beginn dieser Periode um 2 kg zugenommen. Diesmal wurde auch eine Kotanalyse ausgeführt, da der Hund gerade am letzten Hungertage Kot entleerte. Am letzten Eßtag wurde die Nahrung mit Carmin gefärbt. Der Kot vom ersten Hungertag war gefärbt und wurde nicht analysiert. Ebenso wie am letzten Versuch mit den Schilddrüsentabletten war auch in diesem Falle der Verlauf der Stickstoffausscheidung im Harn ein etwas eigentümlicher. Eine sprungweise Steigerung trat erst am letzten Hungertag deutlich ein, dafür waren aber die Stickstoffwerte während der ganzen Hungerzeit auffallend hoch. Der Hund schied im Laufe dieser 8 Tage dauernden Hungerperiode 27,33 g N aus, gegen 19,25 g N in den 8 Hungertagen vom 1. bis 8. VIII., wo er ebenfalls unter der Wirkung des Thyreoglandols[1]) sich befand. Dieser Unterschied in den N-Ausscheidungen rührt

[1]) N-Analyse des Thyreoglandols (neue Sendung): 5 ccm Thyreoglandol verbrauchten 1,90 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4. Kontrollanalyse: 1,90 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4; 1 ccm Thyreoglandol enthält 0,532 mg N.

Tabelle
Hündin II,

Datum		Körpergewicht g	Wasser eingegeben ccm	Thyreoglandol ccm	N eingeführt	Harnmenge ccm
22. VIII. 1916	Letzter Eßtag	15,40	—	kein	—	655
23.	1. Hungertag	15,30	500	„	0,0	455
24.	2. „	15,17	500	„	0,0	400
25.	3. „	14,95	500	„	0,0	615
26.	4. „	14,85	500	18	0,008	625
27.	5. „	14,60	550	18	0,008	570
28.	6. „	14,55	525	18	0,008	560
29.	7. „	14,45	500	18	0,008	490
30.	8. „	14,25	500	28	0,012	475
31.	9. „	14,15	500	26	0,011	570

nicht etwa von der Differenz in den Ausscheidungen in den Normaltagen her. Während der ersten 3 Hungertage vom 23. bis 25. X. waren im Harn 8,17 g N zu finden, während der 3 ersten Hungertage vom 1. bis 3. VIII. schied der Hund 7,67 g N aus. Die Differenz beträgt nur 0,5 g N.

Die prozentische Stickstoffsteigerung, pro Kilo Körpergewicht berechnet und mit den 4 ersten Normalhungertagen verglichen, beträgt im Maximum 55 %.

Beim letzten Versuch mit den Schilddrüsentabletten war die Stickstoffsteigerung nicht von einer erhöhten Diurese begleitet. Auch in diesem Versuch blieb letztere aus. Die tägliche Harnmenge zeigt keine großen Schwankungen.

Während bei mangelhafter Funktion der Schilddrüse und bei vollständigem Fehlen derselben (im Tierexperiment) die Zufuhr von Schilddrüsensubstanz zu einer Steigerung der Stoffwechselvorgänge und zu einer Erhöhung der Stickstoffausscheidung im Harn führt, findet am normalen Menschen oder normalen Tier durch Schilddrüseneingabe eine solche Steigerung nicht immer statt. Einige Autoren, wie z. B. Ad. Dennig, K. Bürger, Andersson und Bergmann, fanden am normalen Menschen eine Erhöhung der Stickstoffausscheidung, andere dagegen, wie

IX.

normal. Hunger.

Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht N ausgeschieden g	Negative N-Bilanz des Harnes	Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 3 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
5,51	0,358	—		
3,68	0,241	— 3,68		
3,65	0,240	— 3,65		
2,65	0,178	— 2,65		
3,17	0,213	— 3,17	keine	Doppelanalyse.
2,60	0,178	— 2,60		
2,01	0,138	— 2,01		
2,75	0,190	— 2,75		
2,48	0,174	— 2,48		
1,80	0,130	— 1,80		Während der ganzen Zeit kein Eiweiß im Harn. — Stickstoffausscheidung durch den Harn = 24,79 g.

W. Scholz, P. Richter, Pfeiffer und Scholz, Zinn u. a., haben eine solche Steigerung nicht beobachten können[1]). Man ist darüber einig, daß normale Menschen und Tiere eine außerordentlich verschiedene Empfindlichkeit Schilddrüsensubstanzen gegenüber aufweisen. Die Wirkung der Schilddrüsensubstanz auf das Normaltier hängt in erster Linie von der individuellen Beschaffenheit des Tieres ab. Nach W. v. Jauregg[2]) kommt es dabei hauptsächlich auf die Schilddrüse an. Bei manchen Normaltieren tritt nach Zufuhr von Schilddrüsensubstanz eine Steigerung der Schilddrüsenfunktion ein, bei manchen aber nicht.

Ich habe das Thyreoglandol auch an einer zweiten normalen 15,4 kg schweren Hündin geprüft. Trotz hoher und 6 Tage lang dauernder Eingaben von Thyreoglandol trat bei diesem Tier keine Stickstoffsteigerung ein. Betrachtet man die in der Tabelle IX angeführten Zahlen über die tägliche Gesamtstickstoffausscheidung und über die pro Kilo Körpergewicht und Tag ausgeschiedenen Stickstoffmengen, so findet man, daß diese im fortschreitendem Sinken begriffen sind.

---

[1]) Vgl. Magnus, Handb. d. Pathol. d. Stoffw. von C. v. Noorden. 2, 1907.

[2]) W. v. Jauregg, Lehrb. d. Organother. **1914**, 114.

Tabelle
Hündin II,

Datum		Körpergewicht g	Wasser eingegeben ccm	Schilddrüsentabletten à 0,324 g	N eingeführt	Harnmenge ccm
22. X. 1916	Letzter Eßtag	15,85	—	keine	—	1680
23.	1. Hungertag	15,30	400	„	0,0	575
24.	2. „	14,28	400	„	0,0	730
25.	3. „	14,02	400	„	0,0	430
26.	4. „	13,80	400	10	0,10	365
27.	5. „	13,69	400	10	0,10	310
28.	6. „	13,57	400	10	0,10	340
29.	7. „	13,40	400	keine	0,0	425
30.	8. „	13,05	400	„	0,0	350

Der Versuch ist insofern höchst wertvoll, als er angibt, daß das Thyreoglandol nicht giftig ist und daß ein toxischer Eiweißzerfall unter dem Einflusse dieser Substanz ausgeschlossen ist. Würde die Stickstoffausscheidung auf einer Zellgiftwirkung beruhen, so müßte ja diese Hündin am meisten Stickstoff zur Ausscheidung bringen, da sie viel mehr Thyreoglandol als die Hündin I bekam. In der Tat bewirkten bei Hündin I 60 ccm Thyreoglandol im normalen Zustande (d. h. bei Erhalt der Schilddrüsen) und 47 ccm nach Thyroidektomie eine mächtige Steigerung des Eiweißstoffwechsels; Hündin II bekam in vorliegendem Versuch 126 ccm Thyreoglandol (rund das 2- bis 3fache), jede toxische Wirkung, sowie jede Stickstoffsteigerung blieb aus.

Dieser Versuch würde also entschieden dafür sprechen, daß die von mir untersuchte wasserlösliche Schilddrüsensubstanz einen spezifischen Einfluß auf den Stoffwechsel ausübt. Übrigens würde ich als weiteren Beweis für die Ungiftigkeit des Thyreoglandols noch anführen können, daß Asher und seine Mitarbeiter, Richardson und Kakehi, gezeigt haben, daß innerhalb der physiologischen Grenzen dieses Präparat keinerlei Wirkung auf das Herz und den Kreislauf auszuüben vermag. Tritt die Stickstoffsteigerung ein, so ist sie nicht etwa Folge einer Intoxikation, sondern der Aus-

X.

normal. Hunger.

Gesamt-N des Harnes	Pro Kilogramm Körpergewicht N ausgeschieden g	Negative N-Bilanz des Harnes	Steigerung pro Kilogramm Körpergewicht im Vergleich mit den 3 ersten Hungertagen %	Bemerkungen
4,66	0,294	—		
2,05	0,134	— 2,05		
2,96	0,208	— 2,96		
3,16	0,225	— 3,16		
3,54	0,257	— 3,44	keine	
3,31	0,242	— 3,21		
2,17	0,160	— 2,07		
2,51	0,188	— 2,51		
1,86	0,143	— 1,86		Der Harn enthielt kein Eiweiß. — Die gesamte Stickstoffausscheidung durch den Harn beträgt 21,56 g.

druck eines in charakteristischer Weise erhöhten Stoffumsatzes. In dieser Auffassung werde ich unterstützt durch den Ausfall meines letzten Versuches an Hündin II. Zur Kontrolle habe ich die Hündin in einer weiteren 8tägigen Hungerperiode mit vollwertigen Schilddrüsentabletten von Burroughs Wellcome gefüttert. Auch in diesem Fall blieb jeder Einfluß auf den Eiweißstoffwechsel aus. Wie in jedem normalen Hungerversuch nehmen die Stickstoffwerte im Harne allmählich ab, und am achten Hungertag scheidet das Tier nur 1,86 g N aus. Nicht nur während der Fütterungsperiode, sondern auch nach Aussetzen der Tablettenzufuhr (Nachwirkung) läßt sich keine N-Steigerung nachweisen.

Diese Hündin gehört somit zu jener nicht seltenen Gruppe von Tieren, die in normalem Zustande (d. h. beim Vorhandensein von Schilddrüse) auf die Zufuhr von Schilddrüsensubstanz nicht mit einer Erhöhung des Eiweißzerfalls reagieren. Es dürfte sich im allgemeinen bei Versuchen an normalen Tieren immer empfehlen, zuerst festzustellen, ob beim betreffenden Tier die Darreichung von Schilddrüse oder einer bereits bekannten vollwertigen Schilddrüsensubstanz eine Veränderung des Eiweißstoffwechsels hervorruft.

Die Schilddrüse gehört zu den jodreichsten Organen des tie-

rischen Organismus (Baumann). Sie vermag auch künstlich zugeführtes, sowohl organisch wie anorganisch gebundenes Jod aufzunehmen. Diese Beziehungen zwischen dem Jod und der Schilddrüse erregen ein sehr hohes Interesse und dienen als Ausgangspunkt für die Aufstellung verschiedener Hypothesen über die Bedeutung dieses Elementes für die Schilddrüsenfunktion. In der Entgiftungstheorie von Blum wurde dem Jod die wichtigste Stellung eingeräumt. Nach Blum sollte die Schilddrüse befähigt sein, die im Stoffwechsel sich bildenden giftigen Eiweißkörper zu entgiften. Dieser Entgiftungsvorgang soll durch Jodieren erfolgen. Zahlreiche andere Autoren (Baumann, Roos, Kocher, Hutchinson, Oswald u. a.) haben, von verschiedenen Gesichtspunkten ausgehend, dem Jod eine führende Rolle zugeschrieben und oft den Jodgehalt und die Wirkung der Schilddrüsensubstanz in Parallele gesetzt. Bürgi[1]) betrachtet das Jod einfach als einen Aktivator des bis dahin unbekannten wirksamen Schilddrüsenkörpers. Das aktive Prinzip der Schilddrüse soll dabei aber jodfrei sein. Auf Grund der Erfahrungen mit der bekannten Acetonitrilreaktion kommen Reid Hunt und Seidell[2]) zum Schluß, daß die physiologische Tätigkeit der Schilddrüse von ihrem Jodgehalt abhängig ist, und zwar in dem Sinne, daß eine jodreichere Schilddrüse wirksamer ist als eine jodarme.

Andererseits fehlt es aber auch nicht an Meinungen und Tatsachen, die das Jod nicht so bedeutungsvoll erscheinen lassen. Es gibt ja Tiere und auch Menschen, deren Schilddrüsen gar kein Jod oder nur ganz minimale Mengen davon enthalten. Dennoch scheinen solche jodarme Schilddrüsen die physiologischen Funktionen ebenso zu erfüllen wie die jodreichen. Jolin[3]) fand den Jodgehalt der menschlichen Schilddrüse sehr inkonstant, irgendwelche Beziehungen zwischen dem Jodgehalt und dem Gesundheitszustande konnte er nicht auffinden. Ohne näher auf weitere Auffassungen über diesen Gegenstand einzugehen, möchte ich meine experimentellen Befunde in ihrer Beziehung zum Jod betrachten.

Die von mir in den Einzelversuchen verfütterten Jodmengen

[1]) Bürgi, Jahreskurse f. ärztl. Fortbildung, 1914 (Lehmanns Verl. München).

[2]) Reid Hunt und Seidell, Bull. Nr. 47, 1909.

[3]) Jolin, Festschr. f. O. Hammarsten, Upsala 1906.

habe ich in folgender Tabelle zusammengestellt. In der letzten Kolonne dieser Tabelle sind die im Maximum gefundenen prozentischen Stickstoffsteigerungen enthalten.

Tabelle XI.

	Thyreoglandol ccm	Tabletten: Zahl	Tabletten: Schilddrüsensubstanz g	Jod eingeführt g	Die höchste gefundene Stickstoffsteigerung %
Hündin I vor der Schilddrüsenoperation (Tabelle IV) . . .	—	100	32,40	0,01620	124
Hündin I vor der Schilddrüsenoperation (Tabelle V)	90	—	—	0,00117	128
Hündin I nach der Schilddrüsenentfernung (Tabelle VI) . . .	84	—	—	0,00109	73
Hündin I nach der Schilddrüsenentfernung (Tabelle VII) . . .	—	60	19,44	0,00972	137
Hündin I nach der Schilddrüsenentfernung (Tabelle VIII) . .	80	—	—	0,00104	55
Hündin II, normal (Tabelle IX)	126	—	—	0,00164	0
Hündin II, normal (Tabelle X)	—	30	9,72	0,00486	0

Das verwendete Präparat Thyreoglandol ist jodarm. Es enthält 0,0013 % Jod. Ich habe 10 ccm Thyreoglandol mit konzentrierter Kalilauge in der Nickelschale unter Zusatz von Kaliumnitrat verascht. Die farblose Schmelze habe ich in heißem Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert, mit Natriumnitrit versetzt und die Flüssigkeit mit 10 ccm Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroform nahm eine kaum wahrnehmbare Rosafärbung an. Das Jod scheint im Thyreoglandol organisch gebunden zu sein. Beim Ausschütteln von 15 ccm Thyreoglandol mit 10 ccm Chloroform unter Zusatz von verdünnter Schwefelsäure und Natriumnitrit konnte keine Rosafärbung des Chloroforms festgestellt werden.

Die Tabletten von Burroughs Wellcome & Co. enthalten 0,05 % Jod in organischer Bindung, der Jodgehalt des Jodthyreoglobulins schwankt zwischen 0,3 bis 0,6 %. Das Thyreoglandol enthält somit rund 40 mal weniger Jod, als die Tabloid Thyroid Gland von Burroughs Wellcome (0,0013 % gegen 0,05 %).

Würde nun das Jod den ausschlaggebenden Faktor der wirksamen Schilddrüsensubstanz darstellen, so müßte ich vom

Thyreoglandol 40 mal mehr geben als von den Schilddrüsentabletten, um ungefähr den gleichen Erfolg zu erzielen. Die Ergebnisse meiner Versuche sprechen aber entschieden gegen eine solche Auffassung. In der Tat habe ich im Versuch vom 4. bis 10. VI. an Hündin I vor der Schilddrüsenseparation (Tabelle IV) mit den verfütterten Tabletten 32,4 g getrockneter Schilddrüsensubstanz zugeführt. In diesen 32,4 g waren 0,0162 g Jod enthalten. Die prozentische Stickstoffsteigerung betrug 124.

Darauf folgte ein Versuch (Tabelle V) mit Thyreoglandol. Es wurden 90 ccm des Präparates eingegeben. Diese 90 ccm entsprechen 90 g frischer Schilddrüsensubstanz und enthalten 0,00117 g Jod, also 14 mal weniger Jod, als die im früheren Versuch gebrauchten Tabloid Thyroid Glands. Betrachten wir die in diesem Falle erzielte prozentische Stickstoffsteigerung, so finden wir, daß sie 128 ausmacht, also genau auf der gleichen Höhe ist, wie im Versuch mit den Tabletten. [Die Quantitäten der verabreichten Schilddrüsensubstanz lassen sich leider nicht vergleichen, da ich in einem Falle getrocknete Schilddrüsensubstanz (Tabloid), im anderen Falle aber ein Extrakt, der auf die frische, also sehr wasserreiche Drüse eingestellt ist, eingab.]

Ähnlich liegen die Verhältnisse auch bei den anderen Versuchsserien. Nach der Schilddrüsenexstirpation erhielt ich mit 80 und 84 ccm Thyreoglandol eine Stickstoffsteigerung von 73 und 55 % (Tabellen VI und VIII). Die dabei eingegebenen Jodmengen waren in einem Fall 0,00109 g (Tabelle VI), im anderen Falle — 0,00104 g (Tabelle VIII).

Im Kontrollversuch (Tabelle VII) erhielt die Hündin I mit den Burroughs Wellcome Tabletten 0,00972 g Jod, also 9 mal mehr als in den beiden Versuchen mit Thyreoglandol. Die hier im Maximum erzielte prozentische Stickstoffsteigerung war 137, sie fiel aber am nächsten Tag auf Null hinunter und war am 3. Tag gleich 53. Nehmen wir aber die Zahl 137 an und achten wir nur auf die Jodmengen, so ergibt sich ebenfalls, daß mit der 9fachen Menge Jod nur eine $2^1/_2$- bis $1^1/_2$ mal so große Stickstoffsteigerung erhalten wurde.

Auch hier läßt sich von irgendeinem sichtbaren Zusammenhange zwischen der Jodmenge und dem Erfolg im Stoffwechselversuche kaum sprechen.

Damit soll aber nicht gesagt sein die im Thyreoglandol

enthaltenen geringen Jodmengen seien physiologisch ohne jede Bedeutung. Es ist gewiß bezeichnend, daß auch dieser eiweißfreie Schilddrüsenauszug, dem ja die als Träger des Jods bezeichneten Stoffe, das Thyreoglobulin und das Jodothyrin, vollkommen fehlten, jodhaltig ist. Es wäre von sehr hohem wissenschaftlichen Interesse, zu versuchen, einen eiweiß- und zugleich auch einen vollkommen jodfreien Auszug aus der Schilddrüse zu gewinnen und diesen dann auf seine Stoffwechselwirkung zu prüfen.

Erst dann hätten wir sichere experimentelle Belege, um zu der einen oder anderen Anschauung über die Jodfunktion Stellung nehmen zu können. Bis dahin muß die Jodfrage als nicht aufgeklärt betrachtet werden. Was speziell meine Stoffwechselversuche anbetrifft, so möchte ich nur hervorheben, daß in diesen die verfütterte Jodquantität eine untergeordnete Rolle spielt. In der Tat habe ich im Vergleich mit Thyreoglandol (Tabelle V) dieselbe Stoffwechselsteigerung erhalten, wie beim Versuch mit den Schilddrüsentabletten (Tabelle IV), trotzdem mit dem Thyreoglandol nur $^1/_{14}$ der in den Tabletten enthaltenen Jodmenge eingegeben wurde. Auch die weiteren Versuche fielen in der gleichen Richtung aus. Therapeutisch wäre die Möglichkeit der Verwendung jodfreier oder wenigstens jodarmer Schilddrüsenpräparate von Bedeutung.

Zusammenfassung.

1. Wasserlösliche, nichteiweißartige und jodarme Schilddrüsenstoffe (Thyreoglandol-Roche) erhöhten den Grundumsatz, d. h. die Stickstoffausscheidung normaler hungernder Hunde, bei einzelnen Individuen sehr bedeutend, bei anderen Individuen dagegen gar nicht. Kontrollversuche mit den üblichen vollwertigen Schilddrüsenpräparaten ergaben das gleiche.

2. Am Hunde mit vollständiger Exstirpation der Schilddrüse, dem zur Verhütung der Tetanie zwei Nebenschilddrüsen erhalten worden waren, steigerten die eiweißfreien Schilddrüsenstoffe in allen Fällen die Stickstoffausscheidung im Hungerzustande.

3. Da der untersuchte Schilddrüsenauszug eiweißfrei und im Vergleich zu wirksamen Schilddrüsentabletten, zu Jodothyrin

und Jodthyreoglubin äußerst jodarm ist, ergibt sich aus obigen Resultaten, daß die bisher als am meisten charakteristisch und als am konstantesten angesehene physiologische Leistung der Schilddrüse nicht an einen Eiweißkörper geknüpft ist und unabhängig von der Höhe des Jodgehaltes der genannten jodreicheren Körper ist.

4. Die erzielten Stickstoffsteigerungen bei Anwendung der eiweißfreien Schilddrüsenstoffe beruhen nicht auf einer toxischen Wirkung, sondern stellen eine spezifische Erhöhung des Eiweißabbaues dar. Dies geht sowohl aus dem Fehlen irgendwelcher Vergiftungssymptome, aus der durch frühere Arbeiten nachgewiesenen Wirkungslosigkeit auf Herz und Kreislauf, als auch aus der Unwirksamkeit des Thyreoglandols an einzelnen normalen Hunden hervor.

5. Die mitgeteilten Versuche liefern neben den Wachstumsversuchen von E. Abderhalden, R. H. Kahn eine neue Grundlage für die Auffassung, daß auch das innere Sekret der Schilddrüse ein relativ einfach gebautes Hormon sei, und daß dem Jod eine weniger präponderierende Bedeutung zukommt, als man bisher annahm.

Für die Therapie wäre Jodarmut wirksamer Präparate besonders günstig.

Untersuchungen über den Ammoniakgehalt des Blutes.

II. Mitteilung.

Von

V. Henriques und E. Christiansen.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 28. Dezember 1916.)

In einem früheren Aufsatz[1]) beschrieben wir eine Methode zur Bestimmung des Ammoniakgehaltes des Blutes. Unser Verfahren bestand darin, daß wir zu 20 ccm des in Oxalat entleerten Blutes kurz nach der Entleerung 80 ccm Äthylalkohol setzten; danach wurde Natriumcarbonat hinzugesetzt, und das befreite Ammoniak wurde durch einen kräftigen Luftstrom in verdünnte Schwefelsäure hinübergesaugt. Aus den mitgeteilten Resultaten ging hervor, daß die benutzte Methode gut übereinstimmende Werte ergab. Zur ferneren Prüfung der von uns angewandten Methode haben wir unter schwankenden Verhältnissen verschiedene Bestimmungen ausgeführt, von denen wir im folgenden eine Darstellung geben werden.

I.

Methodisches.

Wie früher erwähnt, dauerte die Durchlüftung des Blutes zur Austreibung des Ammoniaks im ganzen 3 Stunden. Wir haben versucht, ob eine fortgesetzte Durchlüftung gesteigerte Werte ergab; daß dieses nicht der Fall ist, wird aus folgenden Versuchen hervorgehen.

---

[1]) Diese Zeitschr. Bd. 78.

Versuch 1. Kaninchenblut.

Durchlüftungsdauer Stunden	NH_3N in 100 ccm Blut mg
3	0,49
4	0,50
5	0,42
6	0,48

Versuch 2. In diesem Versuch wurde ein etwas langsamerer Luftstrom angewandt als in Versuch 1.

Durchlüftungsdauer Stunden	NH_3N in 100 ccm Blut mg
3	0,43
4	0,51
5	0,47

Daß die Zahlen von NH_3N im Blute hier etwas höher sind, als es sonst der Fall zu sein pflegt, beruht wahrscheinlich darauf, daß die Blutentnahme fortgesetzt wurde, bis nicht mehr Blut aus der Kanüle herauskam. Es findet unter solchen Verhältnissen eine starke Resorption von Flüssigkeit, auch vom Darmkanal aus, statt, wobei die Ammoniakmenge des Blutes möglicherweise zunehmen kann. Die gefundenen Werte zeigen deutlich genug, daß das Austreiben des Ammoniaks nach 3 Stunden vollführt ist; frühere Versuche haben uns davon überzeugt, daß eine kürzere Zeit als 3 Stunden hinlänglich sein kann; um aber sicher zu gehen, arbeiteten wir mit 3 Stunden. Die gefundenen Werte weichen etwas mehr voneinander ab, als es der Fall zu sein pflegt. Der Grund hiervon kann möglicherweise der sein, daß die Blutkörperchen in dem angewandten Blute geneigt waren, sehr schnell zu Boden zu sinken. Es kann daher nicht genug hervorgehoben werden, daß eine gute Übereinstimmung nur erreicht werden kann, wenn man dafür sorgt, daß das Blut vor der Probeentnahme gut gemischt ist. Wie wir später besprechen werden, ist der Ammoniakgehalt nicht derselbe im Plasma wie in den Blutkörperchen.

Um zu untersuchen, welche Rolle die Temperatur bei der Ammoniakbestimmung im Blute spielt, brachten wir den Blut + Alkohol + Na_2CO_3 enthaltenden Kolben in Wasser variieren-

der Temperatur an. Als Beispiel solcher Versuche soll hier folgender angeführt werden.

Versuch 3. Kaninchenblut. Eine 3 stündige Durchlüftung ergab bei 0° 0,23 mg und bei 16° 0,22 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 4. Dasselbe Blut. Eine 6 stündige Durchlüftung ergab bei 0° 0,26 mg und bei 16° 0,30 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 5. Kaninchenblut und 3 stündige Durchlüftung. Resultat:

Temperatur °C	NH_3N in 100 ccm Blut mg
0	0,26
16	0,32
30	0,54
40	0,72
60	2,21

Aus diesem Versuch geht hervor, daß die Ammoniakmenge schon bei 30° bedeutend höher ist als bei 0° und 16°. Bei 40° und namentlich bei 60° ist die Zunahme sehr bedeutend. Es unterliegt somit kaum einem Zweifel, daß eine Durchlüftung oder Vakuumdestillation bei 45° Werte ergibt, die bedeutend über der tatsächlich vorhandenen Ammoniakmenge liegen.

Wir untersuchten sodann, ob das Versuchsresultat von dem zum Austreiben des Ammoniaks benutzten Stoff abhängig ist, indem wir die Wirkung von Natriumcarbonat und Kalkhydroxyd verglichen, teils bei gewöhnlicher Zimmertemperatur, teils bei 45°. Als Beispiel davon führen wir folgende Versuche an:

Versuch 6. Ziegenblut. Bei ca. 16° fanden sich mit Na_2CO_3 0,31 mg NH_3N und mit Kalkwasser 0,24 mg NH_3N pro 100 ccm Blut, welche Resultate also übereinstimmen. Fand dagegen die Durchlüftung bei 45° statt, so waren mit Na_2CO_3 2,12 mg NH_3N und mit Kalkwasser nur 0,54 mg NH_3N vorhanden.

Versuch 7. Ziegenblut. Bei 16° fanden wir mit Na_2CO_3 0,26 mg, mit Kalkwasser 0,28 mg. Bei 45° dagegen ergab Na_2CO_3 1,81 mg, Kalkwasser dagegen nur 0,53 mg. Eine gleichzeitig nach Bang[1]) ausgeführte Analyse ergab 1,14 mg, welche

[1]) Diese Zeitschr. Bd. 72.

Zahl jedoch nur als Minimalwert betrachtet werden kann, da etwas von der Analyse verloren ging.

Wir stellten sodann einige Versuche an, bei denen das Ammoniak teils mit Kalkwasser, teils mit Magnesia ausgetrieben wurde. Die Versuche wurden ausgeführt sowohl bei 16° als bei 45°. Das Resultat ist aus den folgenden Versuchen ersichtlich.

Versuch 8. Kaninchenblut. Bei 16° fanden wir mit Kalkwasser 0,54 mg, mit Magnesia 0,57 mg NH_3N pro 100 ccm Blut, bei 45° mit Kalkwasser 0,87 mg, mit Magnesia 0,69 mg.

Versuch 9. Kaninchenblut. Bei 16° fanden wir mit Kalkwasser 0,41 mg, mit Magnesia 0,45 mg NH_3N; bei 45° mit Kalkwasser 0,71, mit Magnesia 0,58 mg pro 100 ccm Blut.

Aus den Versuchen geht also hervor, daß es bei gewöhnlicher Zimmertemperatur gleichgültig ist, ob man Natriumcarbonat, Kalkwasser oder Magnesia zum Austreiben des Ammoniaks im Blute benutzt; bei 45° aber wird das Resultat bei der Anwendung von Na_2CO_3 ein weit höheres sein als bei Anwendung von Kalkwasser. Bei 45° ergibt ferner Magnesia etwas niedrigere Werte als Kalkwasser. Will man sich daher gegen eine Hervorrufung einer Abspaltung von Ammoniak von leicht spaltbaren, stickstoffreichen Stoffen im Blute versichern, so hat man die Durchlüftung bei Zimmertemperatur um höchstens 16° auszuführen; es ist dann gleichgültig, ob man Natriumcarbonat, Kalkwasser oder Magnesia benutzt, wohl zu merken, wenn man gleichzeitig den von uns angewandten, reichlichen Zusatz von Äthylalkohol zum Blute benutzt. Um darüber Klarheit zu gewinnen, wo die gesteigerte Ammoniakmenge herstammt, unternahmen wir bei 45° Durchlüftung von Lösungen von Harnstoff, Aminosäuremischungen und Kreatin nach Zusatz von Natriumcarbonat.

Versuch 10. 50 mg Harnstoff werden in 20 ccm Wasser gelöst; es werden 80 ccm Alkohol + Na_2CO_3 hinzugesetzt, worauf möglicherweise vorhandenes Ammoniak durch ca. $1^1/_2$-stündiges Durchlüften entfernt wird; dann wird der Kolben bei 45° im Wasserbad angebracht, und die gewöhnliche Durchlüftung findet statt. In zwei solchen Proben fanden wir 0,068 und 0,040 mg NH_3N.

Versuch 11. Von einer Lösung von Trypsin-Erepsin-verdautem Ziegenfleisch (5,25 g N pro Liter enthaltend) werden

10 ccm genommen, die in derselben Weise, wie oben bei den Harnstofflösungen angegeben, behandelt werden. Vorhandenes Ammoniak wird erst durch eine längere Durchlüftuug entfernt, worauf der Kolben bei 45° im Wasserbad angebracht wird. Nach 3 stündiger Durchlüftung fanden wir in der Vorlage 0,21 mg NH_3N.

Versuch 12. Ca. 0,05 g Kreatin wird in derselben Weise behandelt wie im vorhergehenden Versuch beschrieben. Nach 3 stündiger Durchlüftung fand sich nur eine geringe Spur von Ammoniak.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß die vermehrte Ammoniakmenge, die man bei einer Durchlüftung von Blut bei 45° erhält, teilweise von dem im Blute vorhandenen Harnstoff oder von den Aminosäuren des Blutes stammen kann.

II.

Über die Verteilung des Ammoniaks zwischen Plasma und Blutkörperchen.

Um diese Frage zu untersuchen, zentrifugierten wir Oxalatblut und untersuchten sodann den Ammoniakgehalt teils des Plasmas und teils der hinabzentrifugierten Blutkörperchen. Die in der Weise gefundenen Werte zeigen deutlich, daß während des Zentrifugierens sich etwas Ammoniak bildet, was auch zu erwarten war, da man bei Stehenlassen von Blut nach verhältnismäßig kurzer Zeit immer eine vermehrte Ammoniakmenge findet. Da indessen das Plasma und die Blutkörperchen gleich lange nach der Entleerung stehen bleiben, läßt sich die angeführte Methode doch zur Untersuchung der erwähnten Frage benutzen.

Versuch 13. Kaninchenblut (+ Oxalat) wurde in Zentrifugengläsern angebracht, 40 ccm in jedem. Nach ca. 45 Minuten Zentrifugieren fanden sich ca. 30 ccm Plasma und 10 ccm „Blutkörperchen". Das Plasma wird, insofern dies möglich ist, von den Blutkörperchen entfernt. Es fanden sich in 20 ccm Plasma 0,10 mg NH_3N, während 10 ccm Blutkörperchen 0,103 mg NH_3N enthielten. Diese Bestimmungen fanden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur statt. Eine Probe von „Blutkörperchen" von 10 ccm ergab bei Durchsaugen bei 45° 0,280 mg N.

Versuch 14. Kaninchenblut. Der Ammoniakgehalt des

Blutes, bei gewöhnlicher Zimmertemperatur direkt nach der Blutentnahme bestimmt, war 0,32 mg NH_3N in 100 ccm Blut. Der Rest des Blutes wurde zentrifugiert; von 40 ccm Blut waren bei Beendigung des Zentrifugierens 30 ccm Plasma und 10 ccm Blutkörperchen. Die Ammoniakbestimmung bei gewöhnlicher Temperatur ergab in 20 ccm Plasma 0,082 mg NH_3N, während 10 ccm Blutkörperchen 0,161 mg NH_3N enthielten. Die Blutkörperchen + Plasma in einem der angewandten Zentrifugengläser wurden nach dem Zentrifugieren wieder zusammengeschüttelt, und eine Probe des Blutes ergab dann in 20 ccm 0,149 mg NH_3N. Bei 45° fanden sich folgende Ammoniakmengen: In 20 ccm Plasma 0,215 mg; in 10 ccm Blutkörperchen 0,200 mg NH_3N, während 15 ccm zusammengeschüttelte Blutkörperchen + Plasma 0,223 mg ergaben.

Versuch 15. Kaninchenblut. Der Ammoniakgehalt sofort nach der Blutentnahme war in 20 ccm 0,078 mg NH_3N (0,39 mg NH_3N pro 100 ccm Blut). Nach dem Zentrifugieren hatten die Blutkörperchen einen Raumgehalt von 13 ccm, das Plasma einen solchen von 27 ccm. Die Temperatur des Plasmas nach dem Zentrifugieren war 22°. Einem der Zentrifugengläser wurden 20 ccm Plasma entnommen; sie enthielten 0,102 mg NH_3N. Die Blutkörperchen aus demselben Glas (13 ccm) enthielten 0,133 mg NH_3N. Der Inhalt eines anderen Zentrifugenglases ergab: In 20 ccm Plasma 0,116 mg, in 13 ccm Blutkörperchen 0,178 mg NH_3N. Der Inhalt eines dritten Glases wurde tüchtig geschüttelt; das in der Weise vermischte Plasma + Blutkörperchen enthielt in 20 ccm 0,142 mg NH_3N.

Das Resultat der hier angeführten Versuche wird aus untenstehender Übersichtstabelle hervorgehen.

Der Ammoniakgehalt in Milligramm in Blut, Plasma und Blutkörperchen, berechnet für je 40 ccm.

Durchlüftung bei 16°:

Versuch	Blut	Plasma	Blutkörperchen	Plasma + Blutkörperchen
13	—	0,190	0,412	—
14	0,128	0,164	0,644	0,298
15	0,156	a) 0,204 b) 0,232	a) 0,409 b) 0,548	0,284

Durchlüftung bei 45°:

Versuch	Blut	Plasma	Blutkörperchen	Plasma + Blutkörperchen
13	—	?	0,920	—
14	—	0,430	0,800	0,596
15	—	—	—	—

Aus den angeführten Zahlen geht, wie bereits erwähnt, hervor, daß die Ammoniakmenge des Blutes während des Zentrifugierens bedeutend zunimmt. So fanden wir in Versuch 14 in 40 ccm Blut sofort nach der Entnahme 0,128 mg NH_3N, während wir nach dem Zentrifugieren bei Vermischung des ausgeschiedenen Plasmas mit Blutkörperchen 0,298 mg, also doppelt soviel fanden. Eine Zunahme ähnlicher Art findet sich in Versuch 15, und hier sieht man ferner, daß die Zunahme nicht dieselbe ist in zwei verschiedenen Zentrifugengläsern (a und b). Während des Zentrifugierens nimmt also die Ammoniakmenge zu, und diese Zunahme findet statt sowohl im Plasma als in den Blutkörperchen.

Aus der Tabelle geht ferner mit großer Deutlichkeit hervor, daß die Blutkörperchen weit mehr Ammoniak enthielten pro Volumeneinheit berechnet als Plasma. In Versuch 14 finden wir in 40 ccm Blutkörperchen 0,644 mg NH_3N, während 40 ccm Plasma nur ca. $^1/_4$ soviel, nämlich 0,164 mg enthielten. Auch bei Versuch 15 ist die Ammoniakmenge (sowohl in a als in b) bedeutend höher in den Blutkörperchen als im Plasma. Ferner zeigen die Zahlen der Tabelle, daß die Werte des Ammoniakgehalts sehr bedeutend zunehmen, wenn die Durchlüftung bei 45° statt bei 16° stattfindet.

III.

Von der Ammoniakmenge im Blute verschiedener Gefäßgebiete.

Besonders von russischen Forschern liegen eine große Menge Untersuchungen vor über die Ammoniakmenge im Blute aus der Arteria cruralis und Vena portae[1]). Das Resultat

[1]) Nencki, Pawlow und Zaleski, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37. — Nencki und Pawlow, ebenda 38. — Salaskin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25. — Salaskin und Zaleski, ebenda 29 und 35.

dieser Untersuchungen war in der Hauptsache, daß das Pfortaderblut 3- bis 5 mal mehr Ammoniak enthielt als das Arterienblut. Ungefähr gleichzeitig mit einer Arbeit von Horodynski, Salaskin und Zaleski veröffentlichten Biedl und Wittenberg eine Untersuchungsreihe[1]). Diese Forscher benutzten in einigen ihrer Versuche dieselbe Methodik wie die russischen Physiologen, fanden aber doch einen bedeutend geringeren Unterschied zwischen Arterienblut und Pfortaderblut, als z. B. Nencki, Pawlow und Zaleski gefunden hatten. Eine von den Ursachen der verhältnismäßig hohen Werte der Ammoniakmenge ist sicherlich in der benutzten Methodik zu suchen. Nach Nencki und Zaleskis Methode[2]) wurde das Ammoniak bei einer Temperatur von ca. 35° im Vakuum abdestilliert. Es wurden zur Bestimmung ca. 100 ccm Blut benutzt, das mit Wasser verdünnt wurde, und die Destillation dauerte 5 bis 6 Stunden. Da es sich nun gezeigt hat, daß sich im Blute beim Stehenlassen bei 35° nicht unbedeutende Mengen Ammoniak bilden, muß man annehmen, daß sich während der langwierigen Destillation Ammoniak gebildet hatte. Wir sind daher geneigt, anzunehmen, daß die hohen Werte des Ammoniakgehalts im Blute, die oft bei der Destillation von Blut im Vakuum gefunden worden sind, von dem Umstand herrühren, daß fortwährend kleine Mengen Ammoniak abgespalten werden. Diese Abspaltung kann indessen, wie wir in einer früheren Mitteilung erwähnt haben, durch Zusatz einer größeren Menge von Alkohol zum Blute verhindert werden.

Im Jahre 1912 teilten Folin und Denis[3]) eine Reihe Versuche an Katzen mit, an denen sie den Ammoniakgehalt des Blutes aus verschiedenen Gefäßgebieten bestimmt hatten, hauptsächlich aus dem Arteriensystem und dem Pfortadersystem. Das Resultat dieser Versuche ist in untenstehender Übersicht veranschaulicht.

Bevor wir Folin und Denis' Resultate näher besprechen, werden wir erst die von uns ausgeführten Versuche anführen.

Versuch 16. Kaninchen in voller Verdauung. Äthernarkose. Es wird in die Arteria carotis eine Glaskanüle ein-

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 88, 1901.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 1901.
[3]) Journ. of Biolog. Chem. 11, 161.

geführt. Das Peritoneum wird geöffnet und die Vena portae frei herauspräpariert. Eine Stichkanüle wird in die V. portae hineingeführt, und von dort wird gleichzeitig mit der Blutprobeentnahme aus der Carotis Blut in eine Pipette hinaufgesogen. Der Ammoniakgehalt des Blutes wird in der früher erwähnten Weise bestimmt. Das Carotisblut enthielt 0,22 mg, das Pfortaderblut 0,57 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Tabelle I.

	$MgNH_3N$ in 100 ccm Blut aus						Anmerkungen
	Ven. mesenteric., Dickdarm	Ven. mesenteric., Dünndarm	Ven. portae	Ven. lienalis	Ven. pancreatis	Carotis	
	mg	mg	mg	mg	mg	mg	
Katze 33 . .	0,44	0,05	Spur	—	—	—	Fleischnahrung 2 Tage hindurch; 17stündige Inanition.
„ 34 . .	0,24	0,18	0,13	—	—	—	12 Tage Diät von Dextrose und Rahm.
„ 35 . .	1,60	0,77	0,10	—	—	—	In betäubtem Zustand. Dem Ventrikel war zuvor Fleischnahrung eingegeben.
„ 36 . .	0,44	0,41	0,22	0,05	0,26	0,03	Ventrikel leer.
„ 37 . .	0,58	0,31	—	Spur	—	0,07	Fleischnahrung 4 Tage hindurch; 24stündige Inanition vor dem Versuche.
„ 14 . .	—	—	4,00	—	—	0,40	Dem unterbundenen Dünndarm wurde ein pankreasverdautes Gemisch eingegeben.
„ 38 . .	0,53	0,28	0,32	—	—	0,03	Dem unterbundenen Dünndarm wurden 4 g Glykokoll in 50 ccm H_2O injiziert.
„ 39 . .	—	0,38	0,35	—	—	0,08	5 g Asparagin wurden injiziert in 50 ccm H_2O.

Versuch 17. Kaninchen in voller Verdauung. Urethannarkose. Im übrigen dasselbe Verfahren wie bei Versuch 16. Das Carotisblut enthielt 0,23 mg, das Pfortaderblut 0,67 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 18. Ziegenbock in voller Verdauung. Ätharnarkose. Kanüle in die Carotis. Nach Öffnung des Peritoneums wird ein Glaskatheter in eine Mesenterialvene eingeführt, von wo aus der Katheter in den Pfortaderstamm hinaufgeschoben wird. Das Carotisblut enthielt 0,31 mg, das Pfortaderblut 0,87 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Die folgenden Versuche wurden an hungernden Tieren ausgeführt.

Versuch 19. Kaninchen. 24stündige Inanition. Urethannarkose. Verfahren wie oben. Das Carotisblut enthielt 0,24 mg, das Pfortaderblut 0,67 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 20. Kaninchen. 4tägige Inanition. Urethan. Carotisblut 0,38 mg, Pfortaderblut 0,91 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 21. Kaninchen. 6tägige Inanition. Äther. Carotisblut 0,27 mg, Pfortaderblut 0,63 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 22. Kaninchen. 8tägige Inanition. Urethan. Carotisblut 0,37 mg, Pfortaderblut 0,58 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 23. Katze. 2tägige Inanition. Urethannarkose. Es wird in die Arteria carotis eine Kanüle eingeführt. Nach Öffnung des Peritoneums wird ein Glaskatheter in die Milzvene eingeführt. Der Katheter wird bis zum Pfortaderstamm hinaufgeschoben. Carotisblut 0,15 mg, Pfortaderblut 0,57 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 24. Hund. 19stündige Inanition. Äthernarkose. Es wird in die Arteria carotis eine Kanüle eingeführt; durch die Milzvene wird ein Katheter in den Pfortaderstamm hinaufgeführt. Ferner wird eine ⊥-Kanüle in die Vena femoralis eingeführt, so daß das Blut fortwährend durch die Kanüle strömen kann. Nachdem die Kanülen angebracht sind, werden den 3 genannten Gefäßen gleichzeitig Blutproben entnommen. Nach ca. $1^1/_2$ Stunden werden wieder Blutproben entnommen. Das Blut der ersten Probeentnahme enthielt pro 100 ccm Blut: Carotis 0,29 mg, V. femoralis 0,28 mg, V. portae 0,28 mg NH_3N; das Blut der zweiten Probeentnahme: Carotis 0,32 mg, V. femoralis 0,37 mg, V. portae 0,39 mg NH_3N.

Versuch 25. Hund. 24stündige Inanition. Es wurde in derselben Weise verfahren wie bei dem vorhergehenden Versuch. Das Blut der ersten Probeentnahme enthielt pro 100 ccm Blut folgende Mengen NH_3N: Carotis 0,32 mg, V. femoralis 0,25 mg, V. portae 0,33 mg. Nach ca. $^3/_4$ Stunden entnommene Blutproben enthielten: Carotis 0,26 mg, V. portae 0,25 mg. Bei der Sektion zeigte sich der Dünndarm leer, während der Dickdarm ein wenig Faeces enthielt.

Versuch 26. Hund. 20stündige Inanition. Morphin-

Äthernarkose. Verfahren wie im vorhergehenden Versuch. Das Blut aus der Carotis enthielt 0,31 mg, Blut aus der V. femoralis 0,23 mg, und Blut aus der V. portae 0,27 mg NH_3N pro 100 ccm Blut. Es wurden darauf dem Dünndarm 100 ccm einer 10,5 g Stickstoff pro Liter enthaltenden Lösung von verdautem Ziegenfleisch injiziert. Der Ammoniak-Stickstoffgehalt war ca. 7% des Totalstickstoffs.

Eine halbe Stunde nach der Injektion wurden wieder Blutproben entnommen, die folgende Mengen von NH_3N aufwiesen: Carotis 0,25 mg, V. portae 0,60 mg pro 100 ccm Blut. Die Sektion ergab leeren Dünndarm wie auch Dickdarm.

Versuch 27. Hund. Gewicht 17,9 kg. Morphin-Äthernarkose. In die Arteria carotis wird eine Kanüle eingeführt und nach Öffnung des Peritoneums eine Kanüle in die Milzvene. Das Carotisblut enthielt 0,22 mg, das Milzvenenblut 0,23 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 28. Katze. Gewicht 4 kg. Urethannarkose. Das Tier hatte ca. 20 Stunden gehungert. Operation wie im vorhergehenden Versuch. Das Carotisblut enthielt 0,35 mg, das Milzvenenblut 0,32 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 29. Hund. Gewicht 8,4 kg. Äthernarkose. Ca. 15stündige Inanition. Operation wie oben. Das Carotisblut enthielt 0,29 mg, das Milzvenenblut 0,26 mg NH_3N pro 100 ccm Blut. 30 Minuten später wurden den beiden genannten Gefäßen wieder Blutproben entnommen und außerdem der V. portae durch eine in die Milzvene bei deren Mündung in die V. portae eingeführte Kanüle. Blut aus der Carotis enthielt nun 0,27 mg, das Milzvenenblut 0,32 mg und das Pfortaderblut 0,38 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Versuch 30. Hund. Gewicht 27 kg. Morphin-Äthernarkose. Ca. 15 stündige Inanition. Operation wie oben. Das Carotisblut enthielt 0,36 mg, das Milzvenenblut 0,29 mg und das Pfortaderblut 0,35 mg NH_3N pro 100 ccm Blut.

Umstehende Tabelle gibt eine Übersicht über unsere Versuchsresultate.

Betrachten wir die Zahlen der Ammoniakmenge im Blute aus der Arteria carotis, so sehen wir, daß die Werte im großen ganzen zwischen 0,2 und 0,4 liegen. Nur bei einer Katze, die 2 Tage gehungert hatte, beträgt die Ammoniakmenge 0,15 mg

Tabelle II.

Versuch Nr.	Tierart	Narkose	Blut aus Carotis mg	Ven. femoralis mg	Ven. portae mg	Ven. lienalis mg	Anmerkungen
16	Kaninchen . .	Äther	0,22	—	0,57	—	In voller Verdauung
17	„ . .	Urethan	0,23	—	0,67	—	
18	Ziegenbock . .	Äther	0,31	—	0,87	—	
19	Kaninchen . .	„	0,24	—	0,67	—	Inanition: 24 Std.
20	„ . .	Urethan	0,38	—	0,91	—	„ 4 Tage.
21	„ . .	Äther	0,27	—	0,63	—	„ 6 „
22	„ . .	Urethan	0,37	—	0,58	—	„ 8 „
23	Katze	„	0,15	—	0,57	—	„ 2 „
24a	Hund	Äther	0,29	0,28	0,28	—	„ 19 Std.
24b	Derselbe Hund, $^1/_2$ Std. später	„	0,32	0,33	0,39	—	
25a	Hund	„	0,32	0,25	0,33	—	„ 24 „
25b	Derselbe Hund, $^3/_4$ Std. später	„	0,26	—	0,25	—	
26a	Hund	Morphin-Äther	0,31	0,23	0,27	—	„ 20 „
26b	„	„	0,25	—	0,60	—	Ders. Hund nach Injektion von verdautem Fleisch in den Dünndarm.
27	Hund	Morphin-Äther	0,22	—	—	0,23	
28	Katze	Urethan	0,35	—	—	0,32	Inanition: 20 Std.
29a	Hund	Äther	0,29	—	—	0,26	„ 15 „
29b	Derselbe Hund, $^1/_2$ Std. später	„	0,27	—	0,38	0,32	
30	Hund	Äther-Morphin	0,36	—	0,35	0,29	„ 15 „

pro 100 ccm Blut. Die Ammoniakmenge im Blute aus der Vena femoralis ist nahezu dieselbe wie in der Arteria carotis. In Versuch 24a und b beträgt der Unterschied nur 0,01 mg NH_3N; in Versuch 25a beträgt der Unterschied 0,07 und in Versuch 26a 0,08, welche Unterschiede als innerhalb der Fehlergrenze liegend bezeichnet werden können. Anders stellt sich das Verhältnis beim Pfortaderblut. Hier findet sich bei neulich gefütterten Tieren immer eine größere Menge Ammoniak als im Arterienblut, und dasselbe ist auch der Fall bei Kaninchen sogar nach 8tägiger Inanition und bei einer Katze nach 2tägiger Inanition. Die Werte des Ammoniakgehalts im Blute aus der V. portae liegen in den genannten Fällen zwischen 0,57 und 0,91 mg NH_3N pro 100 ccm Blut; durchschnittlich findet man

(Durchschnitte von 8 Versuchen) 0,68 mg. Anders stellt sich das Verhältnis bei Hunden sogar nach kurzer Inanition. Bei diesen Tieren ist nämlich die Ammoniakmenge im Pfortaderblut ganz dieselbe wie im Arterienblut. Bei Injektion einer Lösung von verdautem Fleisch in den Dünndarm eines Hundes steigert sich die Ammoniakmenge im Pfortaderblut bis auf eine solche Höhe, wie man sie bei Tieren in voller Verdauung antrifft, nämlich 0,60 mg. Vergleichen wir unsere Zahlen der Ammoniakmenge im Blute mit denen von Folin und Denis[1]), so wird man sehen, daß diese Untersucher in einigen Fällen sehr niedrige Werte finden — ja in einigen Fällen wird die Menge nur als „Spur" bezeichnet, und die Menge im Blute aus der Carotis ist meist sehr gering, z. B. 0,03 mg NH_3N pro 100 ccm Blut. In einem Versuch[2]) finden sich im Blute aus „the mesenteric vein of the small intestine" nur 0,05 mg N pro 100 ccm Blut. Nach Folin und Denis soll das Blut aus Milz, Pankreas und Ventrikel, praktisch gesprochen, kein Ammoniak enthalten. Wenn wir in einem früheren Aufsatz ausgesprochen haben, daß Folin und Denis' Zahlen von derselben Größenordnung sind wie die von uns gefundenen, so gilt dies also nicht in allen Fällen. Worauf es beruht, daß Folin und Denis in Arterienblut, und namentlich in Blut aus Ventrikel, Pankreas und Milz, so niedrige Werte wie 0,03 mg oder Spuren finden, ist schwer zu erklären. Leichter verständlich ist es, daß andere Untersucher, die nach der älteren Folinschen Methode mit Durchlüftung von ca. 25 ccm Blut und Titrierung des aufgesammelten Ammoniaks mit NaOH-Lösung arbeiteten, Zahlen fanden, welche die von uns gefundenen weit übertreffen. Wenn man die Durchlüftung des Blutes lange fortsetzt, und wenn man reichlich Natriumcarbonat zusetzt, kann sich ohne Zweifel etwas Ammoniak abspalten, das stets präformiert im Blute vorhanden sein wird; daß wir bei unseren Bestimmungen der starken Wirkung des Natriumcarbonats entgehen, beruht aller Wahrscheinlichkeit nach darauf, daß dieser Stoff bei der von uns benutzten Alkoholkonzentration (80 Teile Alkohol + 20 Teile Blut) nur wenig löslich ist. Wenn z. B. Carlson und

[1]) Journ. of Biolog. Chem. 11.
[2]) Versuch 1 l. c. S. 163.

Jacobson[1]) im Blute von Katzen durchschnittlich 1,57 mg Ammoniak (= 1,29 mg NH_3N) und im Blute von Füchsen sogar 2,39 mg Ammoniak (= 1,97 mg NH_3N) pro 100 ccm Blut finden, so sind diese Werte ohne Zweifel viel zu hoch.

An und für sich wäre es auch sehr sonderbar, wenn das Blut aus Ventrikel, Milz und Pankreas, praktisch gesprochen, nicht Ammoniak enthalten hätte. Dies müßte dann bedeuten, daß diese Organe eine sehr wichtige Rolle als „Entgiftungsorgane" für Ammoniak spielen. Daß dies nicht der Fall ist, geht deutlich aus unseren Versuchen Nr. 27, 28, 29 und 30 hervor. Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß die Ammoniakmenge im Blute aus der Milzvene dieselbe ist wie im Carotisblute. Die kleinen in Frage kommenden Schwankungen liegen innerhalb des Versuchsfehlers.

Résumé.

1. Wenn das Ammoniak im Blute durch die Folinsche Durchlüftungsmethode nach Zusatz einer Base entfernt wird, wird die Temperatur des Blutes von entscheidender Bedeutung für die befreite Menge Ammoniak sein. Bei Temperaturen zwischen 0° und 16° erhält man gleichartige Werte. Bei 40° steigert sich die Ammoniakmenge bis über das Doppelte, und bei 60° erhält man ca. 8 mal größere Werte als bei 16°.

2. Bei Anwendung der von uns angeführten Methode zur Bestimmung der Ammoniakmenge im Blute: 20 ccm Blut + 80 ccm Äthylalkohol und darauf ca. 3 Stunden Durchlüftung (aller Wahrscheinlichkeit nach läßt sich diese Zeit etwas verkürzen) zeigt sich nach Zusatz einer Base, daß man übereinstimmende Werte erhält, vorausgesetzt, daß man als Base Natriumcarbonat, Kalkwasser oder Magnesia benutzt, allerdings nur wenn man die Blut-Alkoholmischung bei einer Temperatur unter ca. 20° hält. Bei höheren Temperaturen, z. B. bei 45°, wird Natriumcarbonat am meisten, Magnesia am wenigsten Ammoniak ergeben, aber alle drei Stoffe ergeben mehr Ammoniak bei 45° als bei 16°.

3. Die Ammoniakmenge in den Blutkörperchen ist bedeutend größer als die im Plasma.

---

[1]) Americ. Journ. of Physiol. 25, 1910.

4. Die Ammoniakmenge im Pfortaderblut ist bei Pflanzenfressern (Ziegenbock, Kaninchen) bedeutend höher als die Ammoniakmenge im Arterienblut, wenn die Tiere auch 8 Tage hindurch gefastet haben. Die von uns gefundenen Werte bei diesen Tieren schwanken beim Pfortaderblut zwischen 0,57 mg und 0,91 mg NH_3N pro 100 ccm Blut. Bei Hunden war die Ammoniakmenge im Pfortaderblut nach kurzer Inanition bedeutend niedriger als bei Pflanzenfressern und lag in der Regel der im Carotisblut vorgefundenen Menge sehr nahe. Die Werte des Ammoniaks im Pfortaderblut lagen bei Hunden zwischen 0,25 mg und 0,39 mg NH_3N, während die entsprechenden Werte des Carotisblutes zwischen 0,25 mg und 0,36 mg schwankten — also nahezu dieselben Zahlen wie beim Pfortaderblut.

5. Arterienblut und Venenblut (V. femoralis) enthalten dieselben Mengen Ammoniak.

6. Arterienblut und Milzvenenblut enthalten dieselben Mengen Ammoniak.

7. Die hohen Werte der Ammoniakmenge im Blute (1 bis 2 mg NH_3N pro 100 ccm Blut) sind sicherlich zu hoch. Auch Folin und Denis' sehr niedrige Werte (0,03 mg oder „Spuren") müssen als irrtümlich betrachtet werden.

Über die physikalisch-chemischen Bedingungen der Leukocytenbewegung.

(Emigration der Leukocyten, Chemotaxis, Phagocytose.)

Von

Ulrich Friedemann und **Alexandra Schönfeld.**

(Aus dem bakteriologischen Laboratorium des städt. Krankenhauses Moabit.)

(Eingegangen am 1. Januar 1917.)

Die im folgenden mitgeteilten Beobachtungen entstanden bei Versuchen, eine geeignete Methode zur Beobachtung der Chemotaxis bei Leukocyten zu gewinnen.

Die steigende Bedeutung, die den Leukocyten im Kampf des Organismus mit den Parasiten nach den neueren Forschungen zukommt, stellt auch die Frage der Chemotaxis wieder in den Vordergrund des Interesses. Es tritt immer mehr hervor, daß das Erscheinen oder Nichterscheinen der Leukocyten in zahlreichen Fällen den Ausgang dieses Kampfes entscheidet. Als eines unter vielen sei das Beispiel der Hühnercholerainfektion herausgegriffen, die in neuerer Zeit besonders eingehend von Weil studiert worden ist. Hier zeigt sich ganz deutlich, daß die Eiterbildung an der Infektionsstelle dem Immunitätsgrade des Tieres parallel geht. Das hochempfindliche Kaninchen geht zugrunde, ohne daß überhaupt Leukocyten in nennenswerten Mengen in dem lokal sich bildenden sulzigen Ödem zu finden sind, während das weit resistentere Meerschweinchen die Infektion mit der Bildung eines örtlichen Abscesses beantwortet. Ebenso wie das Meerschweinchen reagiert aber das Kaninchen, wenn es künstlich durch Injektion eines Heilserums gegen den Hühnercholerabacillus immun gemacht worden ist.

Wie die Immunität des Versuchstieres, so spielt bekanntlich auch die Virulenz der Bakterien bei der Ausbildung der Leu-

kocytose eine entscheidende Rolle. Durch Beobachtungen an Typhusbacillen, Milzbrandbacillen, Streptokokken ist von zahlreichen Untersuchern festgestellt worden, daß avirulente Bakterien Leukocyten anlocken, virulente hingegen nicht oder in viel schwächerem Maße.

Wie sind diese Beobachtungen zu erklären? Lähmen die virulenten Bakterien durch ihre Gifte die weißen Blutkörperchen oder üben sie auf sie nach der Annahme von Marchand, Bordet, Neufeld u. a. überhaupt keinen Reiz aus? Besteht die leukocytosebegünstigende Wirkung des Immunserums in einer Paralysierung der Bakteriengifte oder setzt es erst die in den Bakterien enthaltenen chemotaktisch wirksamen Stoffe in Freiheit[1])?

Zum Studium dieser Fragen waren wir bestrebt, eine Methode zu finden, die eine Beobachtung der Chemotaxis in vitro und dadurch eine genauere Analyse der daran beteiligten Faktoren gestattet. Wie wir vorweg nehmen wollen, sind wir in dieser Richtung zu einem befriedigenden Resultat noch nicht gelangt. Hingegen stießen wir bei unseren Versuchen auf Beobachtungen, die über die physikalisch-chemischen Bedingungen der Leukocytenbewegung Aufklärungen brachten, und die uns an sich wichtig genug erschienen, um zunächst unser ganzes Interesse zu fesseln. Wir gestatten uns daher, über diese Beobachtungen bereits jetzt zu berichten.

Zum Studium der Leukocytenbewegungen bedienten wir uns der von Deetjen[2]) angegebenen Methodik, und zwar benutzten wir zuerst den von ihm empfohlenen Phosphatagar, gingen aber dann zum Gebrauch von Objektträgern aus Quarz oder Jenenser Glas über, nachdem wir uns an frischen Blutpräparaten überzeugt hatten, daß auf diesen die Leukocytenbewegungen ebenso schön zur Beobachtung gelangen. Bei unseren Versuchen stießen wir nun auf eine ganz unerwartete Schwierigkeit. Als wir nämlich nach der gleichen Methode Leukocyten untersuchten, die durch Injektion von Kochsalz-

[1]) Eine eingehendere Erörterung dieser Fragen ist von dem einen von uns a. a. O. gegeben worden. (Friedemann, Infektion und Immunität. Handb. d. Hygiene von Rubner, Gruber u. Ficker. 3, 1. Abteil., 676 bis 695 u. 731).

[2]) Virchows Archiv 164, 1901.

lösung, Bouillon oder Aleuronat in die Bauchhöhle von Meerschweinchen und Kaninchen und Ausspülen des Peritoneums mit isotonischer Kochsalzlösung gewonnen wurden, führten die so erhaltenen Leukocyten keinerlei aktive Bewegungen aus. Sie zeigten sehr bald ein durchsichtiges glasiges Aussehen, an der Peripherie bildeten sich blasenförmige oder strahlige Auswüchse, und schließlich sah es aus, als ob das Blutkörperchen auf der Glasunterlage auseinanderfloß. Die Veränderungen traten nicht überall gleichzeitig ein, und neben stark lädierten Zellen fanden sich längere Zeit auch scheinbar unveränderte. Diese Bewegungserscheinungen gingen im Gegensatz zu amöboiden Bewegungen stets ruckartig vor sich. Niemals konnten wir aber auch nur eine Andeutung von Lokomotion beobachten, wie diese in Blutpräparaten so schön zu sehen ist.

Da wir mit Exsudatleukocyten nicht zum Ziel gelangten, gingen wir so vor, daß wir aus der mit einer Feder leicht geritzten Ohrvene des Kaninchens mittels der Platinöse einen Tropfen Blut entnahmen und diesen auf einem Objektträger von Jenaer Glas sehr rasch mit 2 bis 3 Ösen 0,85%iger Kochsalzlösung vermischten. Nach dem Auflegen des Deckglases wurde der Rand mit Paraffin abgeschlossen und das Präparat im Mikroskopierthermostaten bei 37,5° betrachtet.

Dabei zeigte sich nun, daß auch in den mit Kochsalzlösung verdünnten Blutpräparaten keinerlei Leukocytenbewegung eintrat, ja, es genügte die Vermischung eines Blutstropfens mit einem einzigen Tropfen Kochsalzlösung, um die Bewegung sofort zu sistieren. Es mußte daraus geschlossen werden, daß die Unbeweglichkeit der Exsudatleukocyten in dem Aufschwemmungsmittel, nämlich der isotonischen Kochsalzlösung, ihre Ursache hatte. Dieses Resultat war um so überraschender, als ja gerade die isotonische Kochsalzlösung als das ideale Medium für die Blutzellen betrachtet wird, doch erinnerte es uns an die Versuche, die J. Loeb über die Giftigkeit reiner Kochsalzlösungen auf tierische Organismen angestellt hat. Es lag daher auch für uns am nächsten, die eigentümlichen Wirkungen der Kochsalzlösung durch eine Giftwirkung der Na-Ionen auf das Protoplasma der Leukocyten zu erklären. Traf diese Annahme zu, so mußte nach J. Loeb die Hinzufügung zweiwertiger Ionen die Giftwirkung aufheben. Der Versuch bestätigte jedoch

diese Schlußfolgerung nicht. Denn auch die Benutzung der verschiedenen Salzlösungen, die in ihrer Zusammensetzung dem Blutserum nahekommen, der Ringerschen, der Lockeschen, der Tyrode-Lösung waren die Resultate in keiner Weise besser als in der reinen Kochsalzlösung. Auch die Sättigung der Lösung mit Sauerstoff, wie sie von Locke angegeben wird, hatte keinen Einfluß. Ebensowenig erwies sich der Zusatz von Dikaliumphosphat und Natriummetaphosphat, der nach Deetjen so günstig die Leukocytenbewegung beeinflußt, als wirksam. Die Annahme, daß die Elektrolytzusammensetzung des Mediums die entscheidende Rolle spielt, war demnach sehr unwahrscheinlich geworden.

Die zahlreichen negativen Experimente waren aber nicht vergeblich gewesen, denn sie führten uns zu neuen Versuchen, die in unerwarteter Weise die Lösung der Frage brachten. Während sonst bei hämatologischen Studien die isotonische Kochsalzlösung oder eine dem Blutserum in seiner Zusammensetzung möglichst angenäherte Elektrolytlösung bekanntlich das Blutserum völlig zu ersetzen vermag, zeigte es sich, daß für die Leukocytenbewegungen die Eiweißkörper des Plasmas unentbehrlich sind, und zwar nicht als chemisch reagierende Substanzen, sondern vermöge der ihnen als hydrophilen Kolloiden zukommenden Eigenschaft, die Viscosität der Lösung zu erhöhen. Es gelang uns nämlich, die schönsten Leukocytenbewegungen zu erzielen, wenn wir der isotonischen Kochsalzlösung andere hydrophile Kolloide zusetzten. Am besten bewährte sich die zuerst von uns benutzte Substanz, das Gummi arabicum. Von diesem wurden unter Erwärmen 2%-, 4%-, 8%- und 12%ige Lösungen hergestellt und diese, wie dies vorher geschildert wurde, auf dem Objektträger mit einer Öse frisch entnommenen Blutes gemischt. Schon in den 2%igen Lösungen waren deutliche Bewegungen zu beobachten, lebhafter waren sie in den 4%igen Lösungen, und am schönsten kamen sie in einer 7- bis 8%igen zur Entwicklung. In der 12%igen wurden die Bewegungen träger, und es machte den Eindruck, als ob sie durch die Dickflüssigkeit des Mediums behindert würden.

In einem gut gelungenen Versuch sieht man die weißen Blutkörperchen wie in einem Blutpräparat mit großer Ge-

schwindigkeit durch das ganze Gesichtsfeld kriechen. Kurze Zeit nach Anfertigung des Präparates scheinen die Zellen zunächst in einer Art Starre zu beharren. Dann beginnt in ihrem Zelleib eine lebhafte Stömung der körnigen Protoplasmamasse. Schließlich stülpt sich an einer Stelle der Zelleib hervor, und nun verwandelt sich das Blutkörperchen in eine langgestreckte Zelle, die wie ein Wurm auf der Unterlage fortkriecht. Es handelt sich also bei diesem Phänomen nicht etwa nur um die Aussendung von Pseudopodien, sondern um eine wirkliche Lokomotion. Diese Bewegung konnte bis zu 5 Stunden beobachtet werden.

Daß in der Tat der Viscosität die Gummilösung ihren günstigen Einfluß auf die Leukocytenbewegung verdankt, geht daraus hervor, daß auch andere chemisch ganz anders zusammengesetzte viscöse Flüssigkeiten wie Gelatine, Dextrin und Eiereiweiß ein geeignetes Medium bieten. Allerdings waren die Bewegungen in der Gummilösung am schönsten zu beobachten.

Unsere Erwartung, nunmehr auch mit Exsudatleukocyten weitere Versuche anstellen zu können, erfüllte sich leider nur teilweise, da sich hier Schwierigkeiten einstellten, deren wir noch nicht ganz Herr geworden sind. Zunächst erwies es sich als nicht ganz einfach, ein Mittel zu finden, welches Leukocyten anlockt, ohne sie zu schädigen. Die Eigenbeweglichkeit der weißen Blutkörperchen ist nämlich nach unseren Beobachtungen eine Eigenschaft, die schon bei den geringsten Läsionen verloren geht. Kochsalzlösung, Bouillon und Aleuronat gaben keine günstigen Resultate. Am geeignetsten scheint noch die $8\,^0/_0$ige Gummilösung selbst zu sein, die in großen Mengen (ca. 100 ccm) Kaninchen intraperitoneal injiziert wurde. Nach 20 Stunden wurde das Tier entblutet und die Bauchhöhle mit $8\,^0/_0$iger Gummilösung ausgewaschen. Die so gewonnene trübe Lösung kann direkt im Mikroskopierthermostaten beobachtet werden. — In einigen Fällen gelang es uns auf diese Weise sehr schön, die Bewegungen zu sehen, in anderen Versuchen — und zwar in den meisten — war das Ergebnis ein negatives. Die Schwierigkeit liegt anscheinend darin begründet, daß das Exsudat schon intra vitam, oder aber bei der Entnahme sehr leicht gerinnt. Die sich dabei an den Leukocyten ansetzenden

Fibrinfäden schädigen aber diese offenbar so, daß sie ihre Beweglichkeit völlig verlieren. Dies konnte durch Betrachtung der Leukocyten direkt festgestellt werden. Es ist uns vorläufig nicht gelungen, diese Schwierigkeit so weit zu überwinden, um die beabsichtigten chemotaktischen Versuche an Exsudatleukocyten ausführen zu können, denn die gerinnungshemmenden Reagenzien wie Natriumoxalat, Natriumcitrat und Pepton schädigten ebenfalls die Leukocyten und vernichteten ihre Beweglichkeit sofort. In prinzipieller Weise ließ sich aber auch an Exsudatleukocyten, wie bereits erwähnt, die wichtige Rolle der Viscosität für die Bewegung der weißen Blutkörperchen demonstrieren.

Auch bei der Untersuchung anderer Tiere hatten wir keine besseren Ergebnisse. Im Gegenteil ist das Kaninchen für derartige Versuche bei weitem am besten geeignet. Auch die nach der Blutstropfenmethode durchgeführten Versuche gaben eigentlich nur bei Verwendung von Kaninchenblut schöne Resultate. Im Meerschweinchen- und Menschenblut sind die Bewegungen viel träger, bei der Maus konnten wir sie überhaupt nicht beobachten.

Die mitgeteilten Versuchsergebnisse scheinen uns für die Theorie der Leukocytenbewegung und der Protoplasmabewegung im allgemeinen von Bedeutung zu sein. Bei den folgenden theoretischen Erörterungen wollen wir zwei Voraussetzungen machen, erstens, daß der flüssige Aggregatzustand des Protoplasmas durch die Arbeiten von Engelmann[1]), Bütschli[2]), Berthold[3]), Quincke[4]), Verworn[5]), Jensen[6]), Rhumbler[7]), Macallum[8]) u. a. erwiesen ist, und zweitens, daß dementsprechend die Oberflächenspannungskräfte die Protoplasma-

[1]) Herrmanns Handb. d. Physiologie 1, Teil 1, 343.

[2]) Archiv für Entwicklungsmechanik 11, 1901. — Siehe ferner Verhandl. d. naturhistor.-medizin. Ver. Heidelberg. Die Bände 1893 bis 1896.

[3]). Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig 1886. Zit. nach Rhumbler.

[4]) Annalen d. Physik u. Chemie 35, 1888; Annalen d. Physik 1902 bis 1904.

[5]) Die Bewegung der lebendigen Substanz. Jena 1892.

[6]) Ergebnisse d. Physiologie, Asher-Spiro 1902, II. Abteilung.

[7]) Ergebnisse d. Physiologie, Asher-Spiro 1914.

[8]) Ergebnisse d. Physiologie, Asher-Spiro 1911.

bewegung beherrschen, wie dies außer den genannten Autoren auch Hamburger[1]), Frei[2]) und Traube[3]) u. a. betont haben. Im allgemeinen werden wir dabei die Zelle in grober Schematisierung mit einem vom umgebenden Medium nicht benetzbaren Flüssigkeitströpfchen vergleichen können; doch wird es bei einigen spezielleren Fragen nötig sein, die von Bütschli, Quincke und Rhumbler entwickelten Anschauungen über die Schaumstruktur des Protoplasmas zu berücksichtigen. Die Aussendung von Pseudopodien oder — allgemein gesagt — die Vorwölbung der Protaplasmamasse an einer bestimmten Stelle, wie sie die Leukocytenbewegung einleitet, wird nach den Theorien der genannten Autoren primär durch eine Herabsetzung der Oberflächenspannung an dieser Stelle der Zelloberfläche hervorgerufen. Über die Kräfte hingegen, welche nun weiterhin zur Ausstülpung der Protoplasmamasse führen, sind verschiedene Auffassungen möglich. Es kommt hier in Betracht, ob die Bewegungen auch an der frei in der Flüssigkeit schwebenden Zelle zu beobachten sind, oder ob sie erst eintreten, wenn der Zelleib mit einer festen Unterlage in Berührung kommt. Im ersteren Falle müssen wir nach Jensen in dem einem Flüssigkeitströpfchen innewohnenden Binnendruck die treibende Kraft sehen, während bei Berührung dreier Phasen das bekannte Oberflächenspannungsgesetz in Anwendung kommt, nach dem eine Flüssigkeit a sich an der Grenze zwischen den Flächen b und c ausbreitet, wenn $S^a/_b + S^a/_c < S^b/_c$ ist[4]). Bei den Amöben gibt es nach Jensen frei in der Flüssigkeit sich bewegende Arten und andere, die nur auf einer Unterlage kriechen können. Für die Leukocyten liegen u. W. Untersuchungen nicht vor. Aus dem großen Einfluß, den nach den Untersuchungen von Deetjen die Beschaffenheit der Unterlage auf die Leukocytenbewegungen ausübt (Phosphatagar, Quarz, Jenaer Glas), möchten wir aber schließen, daß die Leukocyten zu jenen Zellen gehören, die nur in Berührung mit einem

---

[1]) Physikalisch-chemische Untersuchungen über Phagocyten. Wiesbaden 1912.

[2]) Schweizer Archiv f. Tierheilkunde **54**, 1912, 221; — u. Pfenninger, Berl. tierärztl. Wochenschr. **1916**, Nr. 33.

[3]) Diese Zeitschr. **1908**, Nr. 10.

[4]) S = Oberflächenspannung.

festen Körper sich aktiv fortzubewegen vermögen. Tatsächlich haben wir auch niemals an frei schwimmenden weißen Blutkörperchen Bewegungserscheinungen gesehen; diese traten vielmehr immer erst ein, wenn die Leukocyten sich zu Boden gesenkt hatten. Mit dieser bisher scheinbar wenig beachteten Frage hängen vielleicht manche an den Leukocyten beobachtete Eigentümlichkeiten, z. B. das Eindringen in Hollundermarkblättchen (Arnold) und die Einwanderung in Fibrinmassen zusammen.

Verfolgen wir die einzelnen Stadien der Leukocytenbewegung unter diesem Gesichtspunkt, so ergibt sich folgendes Bild: Zu Beginn des Versuchs besitzt das weiße Blutkörperchen Kugelgestalt. Die Summe seiner Oberflächenspannungen gegen das flüssige Medium und gegen die Unterlage muß also größer sein als die Oberflächenspannung der Flüssigkeit gegen den Objektträger. Das Aussenden eines Fortsatzes beweist, daß in diesen Beziehungen eine Änderung eingetreten ist. Wären die Leukocyten eine ideale Flüssigkeit, so würden sie sich vollkommen — bis zur Erreichung einer molekularen Schichtdicke — zwischen der Flüssigkeit und dem Objektträger ausbreiten. Daß dies nicht geschieht, deutet darauf hin, daß innere Kräfte einer so weit gehenden Formveränderung der Zelle Widerstand entgegensetzen. Diese Kräfte dürften durch die von Bütschli, Quincke, Rhumbler angenommene Schaumstruktur (Spumoidbau) des Protoplasmas bedingt sein. Denn, wie Rhumbler gezeigt hat, besitzen Schäume eine große Stabilität gegenüber Formveränderungen. Es folgt daraus, daß zwischen diesen inneren Kräften (Spumoidspannung) und den Oberflächenspannungskräften einer Zelle gewisse Beziehungen bestehen müssen, um einerseits ihre Existenz als geformtes Gebilde überhaupt zu ermöglichen, auf der anderen Seite etwaigen, durch Erniedrigung der Oberflächenspannung hervorgerufenen Bewegungen keinen zu großen Widerstand entgegenzusetzen. Sind die beiden Kräfte ungefähr im Gleichgewicht, ist also das Übergewicht, das die eine über die andere gelegentlich erlangt, nur ein geringes, so wird es möglich sein, die resultierenden Bewegungen durch eine Erhöhung des Widerstandes im Außenmedium zu verlangsamen oder zu lähmen. Es folgt daraus, daß die Viscosität oder innere Reibung in diesem Fall

einen entscheidenden Einfluß auf die Zellbewegungen gewinnen muß. Zellen, die wie die Leukocyten in einem stark viscösen Medium leben und an dieses angepaßt sind, müssen bei allen Bewegungen diesen Widerstand des Außenmediums überwinden. Sie müssen also mit starken Veränderungen der Oberflächenspannung arbeiten, oder aber ihr innerer Widerstand gegen Formveränderungen muß ein geringer sein. Letzteres ist nun bekanntlich tatsächlich der Fall. Das Durchkriechen weißer Blutkörperchen durch die Stomata der Capillarendothelien und durch die engen Saftkanäle der Cornea, wobei sie sich zu dünnen Fäden ausziehen, beweist eine Formveränderlichkeit, wie wir sie bei anderen Zellen kaum antreffen.

Im Vergleich dazu werden Amöben oder andere Protozoen, die sich im Wasser aufhalten, eine sehr viel festere Konsistenz haben müssen, da der Widerstand des Außenmediums gegen das Auseinanderfließen bei lokaler Herabsetzung der Oberflächenspannung hier fehlt. Neben der Verfestigung des Wabenbaues der Zelle spielt bei den Amöben bekanntlich auch die Ausbildung festerer Zellmembranen eine Rolle.

Wir sehen also, daß die Leukocytenbewegungen, wie wir sie im Mikroskopierthermostaten auf einer geeigneten Grundlage so schön beobachten können, ein recht kompliziertes physikalisches Phänomen darstellen. Die Viscosität des umgebenden Mediums, die innere Spumoidspannung der Zelle und die Oberflächenspannungen, die bei der Berührung mit der umspülenden Flüssigkeit und dem Objektträger entstehen, müssen sehr fein gegeneinander abgestimmt sein, damit aus einer geringfügigen Veränderung einer dieser Größen — wir wollen zunächst nur die Oberflächenspannung betrachten — eine Bewegung resultiert.

Mit diesem Zusammenspielen mindestens dreier verschiedener Kräfte möchten wir es auch erklären, wenn wir nicht bei allen Tierarten, z. B. der Maus, auf dem Objektträger Bewegungen beobachten konnten, obwohl solche im Tierkörper doch zweifellos vorkommen. Die einfachste Annahme wäre wohl, daß in den Mäuseleukocyten die inneren Spannungen stärker sind als in den weißen Blutkörperchen des Kaninchens. Die Oberflächenspannungskräfte, die bei der Berührung mit dem Objektträger entstehen, genügen also nicht, um diese Kräfte zu überwinden. Wir müßten daraus folgern, daß die

Oberflächenspannung zwischen den Leukocyten und den festen Gewebsbestandteilen, auf denen sie kriechen, eine geringere ist als die gegenüber dem Quarz oder Jenenser Glas, da sie doch im Tierkörper imstande ist, Bewegungen auszulösen. Eine solche Annahme ist auch aus anderen Gründen nicht unwahrscheinlich. Denn die Berührung mit einer für sie ganz ungewohnten Oberfläche wird für die Leukocyten wohl einen gewissen Reiz bedingen, und jede Reizung einer Zelle ist nach den Anschauungen von Verworn, Jensen u. a. mit einer Erhöhung ihrer Oberflächenspannung verbunden. Derartige Überlegungen berühren zwar die prinzipiellen Schlüsse, die wir aus unseren Beobachtungen ziehen, nicht, in quantitativer Hinsicht müssen wir aber doch bei der Übertragung der Ergebnisse in vitro auf die Verhältnisse im lebenden Körper Vorsicht walten lassen.

Was geschieht nun, wenn wir einen der im vorhergehenden ausführlicher besprochenen 3 Faktoren, z. B. die Viscosität des Außenmediums, plötzlich und in erheblichem Grade ändern? Theoretisch läßt sich folgendes voraussagen: Wenn die Leukocyten auf offenbar geringfügige Veränderungen der Oberflächenspannung mit lebhaften Bewegungserscheinungen reagieren, so müssen die drei Kräfte der Oberflächenspannung, der inneren Spannung und der Viscosität sich ungefähr im Gleichgewicht befinden. Oder genauer ausgedrückt: Die innere Spannung des Zellinnern zusammen mit der Viscosität des Außenmediums muß ebenso stark, aber in entgegengesetzter Richtung wirken wie die aus der Berührung der Leukocyten mit der Unterlage sich ergebende Resultante der Oberflächenspannungskräfte. Bleiben also Oberflächenspannung und innere Spannung ungeändert, und wird die Viscosität plötzlich stark vermindert, so muß die Resultante der Oberflächenspannung das Übergewicht erhalten, d. h. das Blutkörperchen muß sich in der Grenzschicht zwischen Flüssigkeit und Objektträger ausbreiten, der Leukocyt muß auseinanderfließen. Dies wird so weit gehen, bis die innere Spannung der Oberflächenspannung wieder das Gleichgewicht hält.

Das ist es nun gerade, was wir bei der Übertragung der Leukocyten in ein eiweißfreies oder doch eiweißarmes Medium beobachtet haben. Das ruckweise Hervorschießen blasiger oder

strahliger Fortsätze macht ganz den Eindruck, als wenn sich eine Flüssigkeit auf einer benetzbaren Oberfläche ausbreitet. Die einzelnen Blasen oder Strahlen schließen sich aneinander, und so entsteht eine stark vergrößerte, schwach lichtbrechende Zelle. Daß dieses Auseinanderfließen so ruckweise und ungleichzeitig geschieht, dürfte wohl mit gewissen Ungleichmäßigkeiten im Bau der Leukocyten im Zusammenhang stehen, die eben doch nicht ideale Flüssigkeitstropfen sind, sondern im Kern und den Protoplasmaeinlagerungen Bestandteile von sehr ungleicher Konsistenz enthalten. Auch wird ja die Oberflächenspannung nicht an allen Stellen denselben Wert besitzen.

Nach dem Auseinanderfließen hat die Zelle offenbar eine maximale Dehnung erfahren, und weitere Bewegungen sind nun nicht mehr möglich.

Wird umgekehrt durch Erhöhung der Konzentration des hydrophilen Kolloids die Viscosität des Mediums mehr und mehr verstärkt, so wächst auch der Widerstand gegen die Formveränderungen der Leukocyten an, so daß die Bewegungen immer träger werden und schließlich ganz ausbleiben. In der Tat sind dies die Erscheinungen, die wir in konzentrierteren Gummiarabicumlösungen beschrieben haben.

Die experimentellen Untersuchungen über die Bedeutung der Viscosität und die sich daraus ergebenden allgemeinen theoretischen Betrachtungen sollen nun im folgenden auf einige spezielle Probleme der Leukocytenbewegung Anwendung finden, auf die Wanderung der Leukocyten im lebenden Gewebe, die Chemotaxis und die Phagocytose. Es können dabei nur die allgemeinen Gesichtspunkte berücksichtigt werden, die sich für diese Erscheinungen aus den neuen Befunden ergeben.

1. Wanderung der Leukocyten im Gewebe.

Eine Wanderung der weißen Blutkörperchen außerhalb der Gefäßbahn ist nach unseren Untersuchungen an eine nicht zu geringe Viscosität der Gewebsflüssigkeit gebunden. Diese schwankt entsprechend dem Eiweißgehalt in den einzelnen Geweben sicherlich in weiten Grenzen. Durch einen minimalen Eiweißgehalt und eine dementsprechend geringe Viscosität zeichnen sich aber der Liquor cerebrospinalis und der

Humor aqueus aus. Nachdem wir gefunden haben, daß Verdünnung des Blutplasmas mit physiologischer Kochsalzlösung auf die Hälfte bereits die Leukocytenbewegung vernichtet, müssen wir es als sehr unwahrscheinlich betrachten, daß die bezeichneten Flüssigkeiten im normalen Zustand ein geeignetes Medium für Leukocytenbewegungen bilden. In pathologischen Zuständen finden sich aber nicht nur massenhaft weiße Blutkörperchen darin, sondern diese sind auch, wie v. Recklinghausen[1]) und Leber[2]) bereits beobachtet haben, aktiv beweglich. Diese Tatsache ist nur dadurch erklärlich, daß im Entzündungszustand der Meningen oder des Auges die von ihnen abgesonderten Flüssigkeiten erheblich eiweißreicher werden. Die Ausschwitzung von Plasmabestandteilen aus den entzündeten Gefäßen erscheint somit in einer bisher unbekannten Bedeutung. Sie hat nicht nur, wie bereits angenommen wurde, die spezifischen Schutzstoffe in das infizierte Gewebe zu befördern, sondern schafft vor allem den in erster Linie dem Schutze des Organismus dienenden Leukocyten die Möglichkeit, sich zu bewegen, indem sie die dazu notwendige Viscosität herstellt. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß auch in den anderen Geweben dieser Faktor eine bedeutsame Rolle bei den Entzündungsvorgängen spielt.

2. Chemotaxis.

Die Nichtberücksichtigung der Viscosität ist ein Versuchsfehler, der unserer Ansicht nach allen Versuchen über Chemotaxis anhaftet, soweit sie Leukocyten betreffen. Besonders tritt dies in den grundlegenden Versuchen H. Buchners[3]) in die Erscheinung, Bekanntlich füllte H. Buchner kleine Capillarröhrchen mit den auf Chemotaxis zu prüfenden Substanzen, versenkte sie in die Subcutis von Kaninchen und brach dort die Spitze ab. Die eingetretene Chemotaxis verriet sich durch einen mehrere Millimeter in das Röhrchen eindringenden Leukocytenpfropf.

---

[1]) Virchows Archiv 28, 1863.

[2]) Die Entstehung der Entzündung. Leipzig 1891.

[3]) Münch. med. Wochenschr. 1890. — Berl. klin. Wochenschr. 1890.

Nach unseren Untersuchungen kann eine Einwanderung in die Röhrchen nicht erfolgen, wenn die in ihnen enthaltene Flüssigkeit eine zu geringe Viscosität besitzt. Diese Schlußfolgerung wird nun durch die Ergebnisse Buchners vollkommen bestätigt. Positiv chemotaktisch waren nämlich die Bakterienproteine, Pflanzencaseine, Alkalialbuminate, Hemialbumosen, also nur die durch starke Viscosität ausgezeichneten Lösungen hydrophiler Kolloide, während Peptone, Aminosäuren und sämtliche übrigen von ihm untersuchten krystalloiden Stoffe wirkungslos waren[1]). Sehr bezeichnend ist hierfür der Unterschied zwischen der kolloidalen Hemialbumose und den ihr chemisch nahestehenden, aber krystalloid gelösten Peptonen und Aminosäuren.

Die negativen Resultate dieser Versuche besitzen also keine Beweiskraft; denn es wäre wohl möglich, daß dieselben Substanzen in der Gewebsflüssigkeit chemotaktische Wirkungen entfalten würden, die unter den von Buchner geschaffenen künstlichen Bedingungen nicht in die Erscheinung treten können.

Umgekehrt ist es uns aber auch zweifelhaft geworden, ob die Ergebnisse Buchners auf chemotaktische Vorgänge im strengen Sinne des Wortes zurückgeführt werden müssen. Es ist doch sehr auffallend, daß alle untersuchten viscösen Stoffe auch positiv chemotaktisch wirkten, und es liegt die Vermutung nahe, daß die Leukocyten sich in diesen Flüssigkeiten nur ansammeln, weil sie ihnen so günstige Bedingungen für die Bewegung bieten. In dieser Annahme werden wir durch eine Beobachtung bestärkt, die Frl. Dr. Rosenblat im Laboratorium des einen von uns (F.) gemacht hat. In Versuchen, die nach der von Hamburger angegebenen Modifikation der Buchnerschen Methode angestellt wurden, fand nämlich Frl. Dr. Rosenblat, daß von allen geprüften Substanzen das Blutserum des Kaninchens bei weitem am stärksten Leukocyten in die Capillaren hineinlockte, eine im chemischen Sinne für diese Zellen gewiß recht indifferente Substanz. Weitere systematische Untersuchungen werden also nötig sein, um die durch unsere

[1]) Buchner nimmt an, daß die Proteine beim Abbau ihre chemotaktischen Eigenschaften verlieren, betrachtet aber die Ergebnisse nicht aus dem hier hervorgehobenen physikalisch-chemischen Gesichtspunkte.

Versuchsergebnisse aufgetauchten Fragen zu entscheiden. Man könnte danach versucht sein, die Existenz einer Leukocytenchemotaxis überhaupt als unbewiesen zu betrachten, wenn dem nicht die klassischen Versuche Lebers im Wege ständen.

Leber[1]) versenkte die Capillarröhrchen in die vordere Kammer des Kaninchenauges. Er fand nun, daß auch fast unlösliche Substanzen, wie Kupfer, Quecksilber, Zinnober, Indigo, Schwefel, Bariumsulfat, Graphit, leukocytenanlockend wirkten. Die Versuchsergebnisse scheinen zunächst überhaupt mit unseren Schlußfolgerungen im Widerspruch zu stehen. Denn wie sollen sich die Leukocyten in den mit einer wässerigen, also nicht viscösen Flüssigkeit gefüllten Capillaren bewegen?

Den Schlüssel zur Lösung dieses Widerspruchs bildet offenbar die ausdrückliche Angabe Lebers, daß das Kammerwasser in seinen Versuchen infolge der entzündlichen Reizung des Auges stark eiweißhaltig war. Wir müssen annehmen, daß erst mit dem Eindringen des Kammerwassers in die Capillarröhrchen auch die Leukocyten ihren Weg dorthin fanden. Es geht daraus hervor, daß auch die Leberschen Versuche in ihrer Deutung viel komplizierter sind, als Leber bei seinen Untersuchungen vermuten konnte.

Außer mit der Technik chemotaktischer Versuche haben unsere Ergebnisse aber auch mit deren Theorie Berührungspunkte. Nach den Ansichten von Rhumbler, Hamburger, Frei u. a. kommt die chemotaktisch gerichtete Bewegung durch eine einseitige Herabsetzung der Oberflächenspannung und eine dieser folgende Pseudopodienaussendung zustande. Wie wir im allgemeinen Teil gesehen haben, kann das gleiche Resultat nach einer einseitigen Herabsetzung der Viscosität theoretisch erwartet werden. Derartige Verhältnisse dürften bei der Durchwanderung der weißen Blutkörperchen durch die Endothellücken der Blutcapillaren gegeben sein. Legt sich ein Leukocyt, wie dies Cohnheim beobachtet hat, fest an die Gefäßwand an, so kommt es durch die zwischen den Endothelzellen befindlichen Stromata mit der sehr viel eiweißärmeren, also weniger viscösen Gewebsflüssigkeit in Berührung. Nach unseren Beobachtungen

[1]) l. c.

ist daher zu erwarten, daß an diesen Stellen das Protoplasma der Leukocyten heraustreten wird. Wir halten uns für berechtigt, die Ansicht zur Diskussion zu stellen, daß die Durchwanderung der Leukocyten durch die Gefäßwand nicht durch chemotaktische Reize, sondern durch das Viscositätsgefälle von dem Gefäßlumen nach dem Gewebe verursacht wird.

3. Phagocytose.

Die wichtigsten Folgerungen aus unseren Untersuchungen ergeben sich aber für die Lehre von der Phagocytose. Wir konnten uns überzeugen, daß diese ein von der aktiven lokomotorischen Leukocytenbewegung verschiedener Vorgang ist. Phagocytose wird nämlich auch bei Leukocyten beobachtet, die unter den gegebenen Bedingungen zu einer aktiven Bewegung unfähig sind.

Nach der von Neufeld angegebenen Methode wird die Phagocytose mit Exsudatleukocyten angestellt, die auf der Zentrifuge mit Kochsalzlösung oder Natriumcitricumlösung gewaschen worden sind. Nach unseren sehr zahlreichen Erfahrungen sind solche Leukocyten völlig unbeweglich, selbst wenn man sie in einer an sich für die Leukocytenbewegung geeigneten Gummiarabicumlösung suspendiert. Trotzdem sind solche Leukocyten sehr wohl befähigt, sensibilisierte Bakterien in großen Mengen in sich aufzunehmen.

Verfolgt man nun den Vorgang der Phagocytose unter dem Mikroskop, so sieht man, daß er von der Art und Weise, wie eine Amöbe ihre Nahrung in sich aufnimmt, grundverschieden ist. Keine Aussendung von Pseudopodien, kein Herumfließen der Zelle um die Bakterien, keinerlei Fortbewegung der Leukocyten.

Die Aufnahme der Bakterien in die Zelle erfolgt so blitzartig, daß es gar nicht möglich ist, sie in ihren einzelnen Phasen mit dem Auge zu verfolgen. Beobachtet man scharf ein neben einem Leukocyten liegendes Bakterium, so kann man nur feststellen, daß es plötzlich in dem weißen Blutkörperchen verschwunden ist. Die Erscheinung erinnert viel-

mehr an die Anziehung kleinerer Flüssigkeitströpfchen durch größere als an die aktiven Bewegungen einzelliger Lebewesen.

Offenbar handelt es sich bei der Phagocytose um ein von der Lebenstätigkeit der Leukocyten weit weniger abhängiges physikalisch-chemisches Phänomen als bei der Wanderung der weißen Blutkörperchen. Ja, es erscheint uns durchaus nicht ausgeschlossen, daß auch tote Leukocyten noch phagocytieren können. Die Ausbreitungserscheinungen, die Leukocyten in isotonischer Kochsalzlösung auf dem Objektträger zeigen, müssen jedenfalls mit einer tiefgehenden Veränderung der Zellstruktur einhergehen und machen durchaus den Eindruck von Absterbeerscheinungen. Gerade die am Glase haftenden Leukocyten beteiligen sich aber nach den Angaben Neufelds besonders stark an der Phagocytose.

Diese Befunde würden sehr gut mit den Rhumblerschen[1]) Ansichten über die Phagocytose übereinstimmen. Rhumbler gelang es nämlich, die Erscheinungen der Phagocytose an leblosen Gebilden vollkommen nachzuahmen. Kleine mit Schellack überzogene Glasstäbchen wurden von Chloroformtröpfchen aus Wasser geradeso aufgenommen wie Bakterien von den weißen Blutkörperchen. Nach Rhumbler kommt dieser Vorgang dadurch zustande, daß die Adhäsion des Schellacks zum Chloroform größer ist als die Summe seiner Adhäsion zum Wasser und der Kohäsion des Chloroforms. Die gleichen Betrachtungen haben für die Aufnahme von Bakterien durch weiße Blutkörperchen zu gelten, wenn wir die Schellackglasstäbchen mit den Bakterien, die Chloroformtröpfchen mit den Bakterien vertauschen.

Daß bei den nahen Beziehungen zwischen den hier in Betracht kommenden Oberflächenkräften und capillar-elektrischen Erscheinungen auch elektrische Ladungen bei der Phagocytose eine Rolle spielen werden, darauf hat der eine von uns [F.][2]) schon an anderer Stelle hingewiesen. Werden Bakterien mit einem spezifischen Immunserum sensibilisiert, so erhöht sich nach den Versuchen von Neißer und Friedemann[3]),

[1]) l. c.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsf. **5**, 639, 1909. — Vgl. a. Hirschfeld, Zeitschr. f. allgem. Physiologie **1909**.

[3]) Münch. med. Wochenschr. **1903**, Nr. 11; **1905**, Nr. 19.

Bechold das Potential ihrer elektrischen Oberflächenspannung. Die daraus resultierende Abstoßung der in der Zelloberfläche gelegenen Moleküle muß Adhäsions- und Adsorptionserscheinungen begünstigen, und so dürfte sich am einfachsten die phagocytosebefördernde (opsonische, bakteriotrope) Wirkung spezifischer Sera erklären.

In dem gleichen Sinne ist wohl der von Hamburger[1]) und seinen Mitarbeitern, sowie von Oker-Blom[2]), Frei[3]) u. a. nachgewiesene Einfluß von Elektrolyten auf den Vorgang der Phagocytose zu deuten.

Ob der importierte Fremdkörper einfach in die Zelle hineingleitet, ohne daß diese ihre Form ändert, wie wir dies bei Bakterien beobachten, oder ob die Zelle den Fremdkörper umfließt, wie dies bei Amöben, aber auch bei der Phagocytose von Milzbrandfäden durch Froschleukocyten der Fall ist, hängt von der Größe des importierten Körpers und dem Widerstand, den er der Bewegung entgegensetzt, ab. In beiden Fällen ist das Bestreben, eine minimale Oberfläche zwischen dem importierten Körper und der Zelle herzustellen, maßgebend.

Während aber der erstere Vorgang auch bei den auf der Oberfläche des Objektträgers ausgebreiteten, in ihrer Form nicht mehr veränderlichen Leukocyten möglich ist, setzt das Umfließen des Fremdkörpers noch eine ausgiebige Formveränderlichkeit der Leukocyten voraus.

Das gleiche gilt natürlich für die spontanen Bewegungen, die wir an den Leukocyten auf dem heizbaren Objekttisch oder im Tierkörper beobachten. Die Regelmäßigkeit dieser Bewegungen, die sich kontinuierlich von einer Stelle der Zelloberfläche zur anderen fortsetzen und im ausgesprochenen Gegensatz zu den ruckartigen Formveränderungen stehen, denen die Leukocyten beim Übergang in isotonische Kochsalzlösung unterliegen, ist offenbar an die Struktur der lebenden Zelle gebunden. Die Schaumstruktur des lebenden Protoplasmas dürfte es sein, die durch ihre Stabilität die bei homogenen Flüssigkeiten blitzartig erfolgenden Ausbreitungserscheinungen

---

[1]) l. c.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsf. **14**, 485, 1912.

[3]) l. c.

modifiziert und verlangsamt. Erst wenn durch den Fortfall der Viscosität des Außenmediums die Innenspannung der Wabenwände überwunden und die Schaumstruktur tiefgreifend verändert wird, sehen wir auch an den Leukocyten jene ruckartigen Ausbreitungserscheinungen, die für die Oberflächenspannungsphänomene so charakteristisch sind.

Die Leukocytenbewegungen sind also an das Leben der Zelle gebunden; die Phagocytose ist hingegen auch an Zellen zu beobachten, die jede Beweglichkeit eingebüßt haben. Im physikalischen Sinne sind diese Zellen als tot zu bezeichnen, auch wenn sie noch zu den chemischen Attributen des Lebens (Atmung, Stoffwechsel usw.) befähigt sein sollten.

Zur Frage der Restreduktion des Blutes in Beziehung zu den reduzierenden Komponenten des Reststickstoffs.

Ergänzung.

Von

Joh. Feigl.

(Aus dem Chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Barmbeck.)

(Eingegangen am 6. Januar 1917.)

Unter Umständen, die auch bei der heutigen allgemeinen Lage nicht vorauszusehen waren, mußten geplante Untersuchungen vorerst abgebrochen werden, die Vergleiche in den Reduktionswirkungen von Zuckern und Nichtzuckern auf den Verlauf und die Ergebnisse von gebräuchlicheren Methoden der Bestimmung des Blutzuckers zum Gegenstande haben. Aus dieser Sachlage erhellt vorläufig für die Bewertung des Umfanges der Restreduktion durch Nichtkohlenhydrate eine zwar keineswegs prinzipielle, aber in ihren Folgerungen graduell nicht gleichgültige Modifikation der überschläglichen Rechnungen.

Legt man zunächst die bewährte makroskopische (Hydroxylamin-) Titration von I. Bang zugrunde, so ergibt sich eine Abweichung, die die anfänglichen Schätzungen vergrößert. Für die bisher geäußerten Verhältnisse der Reduktionsquoten steigender Kreatininmengen sprechen einige Gründe, die aber, wie gesagt, vorerst experimentell nicht weiter diskutiert werden können. Übernimmt man nun einstweilen die ursprünglichen, von Bang[1]) selbst ermittelten, später in der wertvollen Arbeit von Hilding-Lavesson[2]) verwerteten Beträge uneingeschränkt in die Erörterung über die Restreduktion als Grundlage, so verschieben sich alle Berechnungen, die an höhere Kreatininmengen anknüpfen, um rund die Hälfte nach oben. Indem für 7 mg Kreatinin als Äquivalent im Reaktionsvorgange ganz allgemein 4,8 mg Glucose eingesetzt werden, wird somit nach Bang die Reduktionskraft des Kreatinins unabhängig

---

[1]) Ivar Bang, diese Zeitschr. 2, 271, 1906; Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 8.

[2]) Hilding-Lavesson, diese Zeitschr. 4, 40, 1907.

von den relativen Reaktionsverhältnissen als leidlich konstant angesehen und kann mit rund 70 % der Glucose beziffert werden. Verfolgen wir z. B. die von Myers und Fine[1]) gefundene Höchstzahl zur Retentionskreatininämie (intra vitam), die 33 mg in 100 ccm Blut angibt, so würden ebendieser rund 23 mg Glucose entsprechen. Bleibt man in einem schematischen Rechnungsbeispiele mit der Annahme von 80 mg Glucose, so würden also nahezu 30 % der wahren Reduktion als Restreduktion, allein durch Kreatinin, figurieren. Demnach kann letzteres für sich in hohen (Grenz-)Werten an 30 % der Gesamtreduktion ausmachen, während Beträge, die an 20 % berechnet ergeben würden, nicht eben selten zu sein brauchen, wie Zahlen von Folin und Denis, Myers und Fine, Rosenberg, Feigl[2]), Feigl und Luce[3]) lehren. Wie wir später bei der Behandlung der Blutzuckerfrage im Gebiete des Morbus Brightii zu zeigen hoffen, spielt die Restreduktion des Kreatinins eine erhebliche Rolle, die unter obiger Annahme also höher als bisher dargelegt, zu bewerten ist. Sicher ist jedoch, daß die Frage der Reduktionskraft des Kreatinins, sowohl die reine Substanz, als auch die entsprechenden Gemische betreffend, manche problematischen und expermentell diffizilen Züge, namentlich bei der Methode Makro-Bang, einschließt. Abgesehen von der Menge des Lösungswassers, die gleich zu machen ist, spielt offensichtlich der Grad der Hydrolyse zum Kreatin eine Rolle, für den der etwaige, kaum je konstante Verlust von Kohlendioxyd in Betracht kommt. Sicher hat man es häufig mit Gemischen von Kreatinin und Kreatin (sekundär entstanden) zu tun, deren Reduktionsquote keine spezifische mehr ist und die nicht einheitlich von der Zeit des Kochens beeinflußt wird — Erscheinungen, die in den vielartigen Gemischen der Blutfiltrate übereinander laufen.

Für die in die Diskussion der Restreduktionsverhältnisse eingeführten Grenz- und Normalwerte Gesunder käme eine Umformung des rechnerischen Überschlages kaum in Frage, wofern nicht die obere Grenze des normalen Kreatingehaltes hinaufgesetzt wird auf 10 mg. Die hohen Grenzwerte für Gesamtkreatinin unter urämischen Verhältnissen findet man bei Folin mit über 30 mg, selbst bis 46 mg in 100 ccm aufgeführt; Feigl und Luce nennen solche ähnlichen Ausmaße bei akuter gelber Leberatrophie.

Die Bedeutung des Kreatinins und Kreatins für die Frage der Restreduktion des Blutes erhellt sonach aus der Angabe, daß ersteres $^1/_3$ der wahren Reduktion ausmachen kann und daß erst eingehendes deskriptives Material über das Vorkommen beider Stoffe in den verschiedensten Zuständen abgewartet werden muß, wo nicht die Pikratmethode von Lewis und Benedict wie von Myers und Bailey ihre Eignung weiterhin erweist unter Umgehung des fraglichen Anteiles im bis-

---

[1]) Myers und Fine, Journ. of Biolog. Chem. **20**, 391, 1915.

[2]) Feigl, diese Zeitschr. **77**, 202, 1916.

[3]) Feigl und Luce, diese Zeitschr. **1917**, 79 (Festschrift für Joh. Orth.)

herigen Begriffe der Restreduktion. Bang selbst setzt die Reduktionskraft der Harnsäure zu 35 % der reinen Glucose ein. Bleibt man bei dieser Annahme, so würden sich alle Betrachtungen über die Restreduktion durch Purin erniedrigen und die Uricämien ohne Kreatinin- bzw. Kreatinämie am wenigsten beeinflußt werden. Für nephrogene Retentionen, die erfahrungsgemäß oft — nicht proportional — beide Gruppen erfassen, würde sich diese Herabsetzung durch die höhere Veranschlagung für Kreatinin kompensieren bzw. überkompensieren. Zu solchen Fällen, deren Restreduktion aus hohem Purin- wie Kreatin- wie Kreatiningehalt hervorgeht, zählen auch die von Feigl und Luce beschriebene akute gelbe Leberatrophie, sowie Beri-Beri und Skorbut, auf deren Werte hinzuweisen ist. Diese ergeben summarische Restreduktionen, die berechnet auf 80 mg Glucose, bis zur Hälfte dieses Betrages erreichen können.

Zur vorgenannten Arbeit 1916, Band 77, 3. und 4. Heft, S. 202, Zeile 9 soll es heißen: . . . zu 200 % des Grundwertes und mehr . . .

Über heterophile Normalamboceptoren.

Ein Beitrag zur Lehre von der Entstehung der normalen Antikörper.

Von

Ulrich Friedemann.

(Aus dem bakteriologischen Laboratorium des städtischen Krankenhauses Moabit.)

(Eingegangen am 1. Januar 1917.)

Durch die im Jahre 1911 beginnenden Arbeiten von Forßmann haben unsere Kenntnisse von den Eigenschaften der Amboceptoren eine in ihrer Bedeutung noch nicht abzuschätzende Erweiterung erfahren. War auch schon vorher ein Übergreifen der Amboceptorwirkung auf die Zellen verwandter Tierspezies bekannt und mit der Ehrlich-Morgenrothschen Receptorenlehre durchaus im Einklang, so muß doch die aus den Forßmannschen Versuchen sich ergebende Verbreitung des gleichen Antigens bei den fernstehendsten Tierarten als eine neue und biologisch sehr interessante Tatsache gewertet werden.

Grundlegend war die Entdeckung Forßmanns[1]), daß es gelingt, durch Injektion von Meerschweinchen- und Pferdeorganen beim Kaninchen spezifische Hämolysine für Hammelblut zu erzeugen. Durch die Arbeiten von Orudschiew[2]), Sachs und Nathan[3]), Dörr und Pick[4]), Tsuneoka[5]), Friedberger und Schiff[6]) wurde dann festgestellt, daß auch die

[1]) Diese Zeitschr. **87**, 78, 1911.
[2]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **16**, 268, 1913.
[3]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **19**, 235, 1913.
[4]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **19**, 251, 1913.
[5]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **22**, 567.
[6]) Berl. klin. Wochenschr. **1913**.

Organe der Katze, der Maus, der Schildkröte, des Hundes, des Huhns und die Kiemen einiger Fische die Bildung von Hammelblutamboceptoren auslösen, während die Organe des Kaninchens, des Menschen, des Rindes, des Schweines, der Ratte, des Hammels, der Gans in dieser Hinsicht unwirksam sind. In den Geweben der erstgenannten Tierklasse muß also ein Antigen vorhanden sein, das sich durch sein Vorkommen bei Vertretern der fernstehendsten Tierklassen von den bekannten, im allgemeinen artspezifischen Antigenen unterscheidet. Über die Verbreitung dieses interessanten Antigens in den verschiedenen Organsystemen sowie über seine Eigenschaften verdanken wir vor allem den Arbeiten von Dörr und Pick[1]) Aufschluß. Aus diesen Versuchen sei hervorgehoben, daß sich das Forßmannsche Antigen von den meisten bekannten Antigenen durch eine so hochgradige Thermoresistenz auszeichnet, daß es stundenlang ohne Änderung seiner spezifischen Eigenschaften gekocht werden kann. Auf diesem Wege gelang es Dörr und Pick, nachzuweisen, daß in den Hammelblutkörperchen zwei Antigene vorhanden sind, ein artspezifisches thermolabiles und das thermostabile Forßmannsche Antigen. Diesem letzteren Umstande verdankt auch das Hammelblut seine Eignung, als Indicator für Forßmannsche Amboceptoren zu dienen.

Über die chemische Natur des Forßmannschen Antigens ist, wie über die Antigene überhaupt, wenig bekannt, doch scheint es nach den Versuchen von Dörr und Pick in die Klasse der Nucleoproteide zu gehören.

Die durch heterologe Organinjektionen gebildeten Hammelblutamboceptoren unterscheiden sich von den durch Hammelblut erzeugten in mancher Hinsicht. Während nämlich die letzteren nach den Untersuchungen von Ehrlich und Morgenroth auch Ziegen- und Rinderblut lösen, wirken die Forßmannschen Amboceptoren merkwürdigerweise in spezifischer Weise nur auf Hammel- und Ziegenblut. Der Kürze halber werde ich im folgenden die durch heterologe Organinjektionen erzeugten Ambocetoren als **heterophile**, die durch Hammelblut gebildeten als **isophile** bezeichnen. In dem gleichen Sinne sollen

[1]) l. c. diese Zeitschr. 50.

die Organe, die das Forßmannsche Antigen enthalten, heterophile Organe genannt werden[1]).

Die Beziehungen zwischen Antikörper und Antigen sind bei den heterophilen Amboceptoren ähnliche wie bei den isophilen. So haben besonders Orudschiew, Sachs und Nathan, sowie Dörr und Pick gezeigt, daß die Organe, welche heterophile Amboceptoren erzeugen, diese auch in vitro zu binden imstande sind.

Nach diesen Feststellungen, die im wesentlichen die derzeitigen Kenntnisse über das Gebiet der heterophilen Antigene und Amboceptoren umfassen, haben dann Sachs und Nathan, Dörr und Pick, Forßmann und Hintze[2]) gezeigt, daß die neuen Tatsachen geeignet sind, einige bisher unerklärte Beobachtungen im Gebiet der Anaphylaxie in einfacher Weise verständlich zu machen, worauf jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann.

In der folgenden Arbeit soll über Versuche berichtet werden, die sich mit den Beziehungen der heterophilen Amboceptoren zu den Hammelblutamboceptoren des normalen Serums beschäftigen, eine Frage, die in mehr als einer Richtung Interesse beanspruchen kann.

Folgende Punkte schienen mir einer experimentellen Erforschung zugänglich zu sein:

1. Entsprechen den immunisatorisch erzeugten heterophilen Amboceptoren im normalen Serum Amboceptoren von den gleichen Eigenschaften?

2. Wenn diese Frage bejaht wird, bestehen zwischen dem Gehalt des Serums an normalen heterophilen Amboceptoren und der Anwesenheit von heterophilem Antigen in den Organen irgendwelche Beziehungen?

Der Nachweis von heterophilen Amboceptoren im normalen Serum würde zunächst über die Genese der Immunamboceptoren gewisse Aufschlüsse geben, indem er, wie auf

[1]) Friedberger hat die Bezeichnungen heterogenetisch und isogenetisch vorgeschlagen. Ich habe diese verlassen, weil sie zwar sehr passend für Immunamboceptoren sind, nicht aber für die in dieser Arbeit behandelten Normalamboceptoren. Auch ist es bei der Friedbergerschen Benennung nicht möglich, einen entsprechenden Namen für die Organe zu finden.

[2]) Diese Zeitschr. 44.

anderen Gebieten der Immunitätslehre, zeigen würde, daß die Immunkörperbildung nur auf eine Steigerung physiologischer und bereits spezifisch gerichteter Zelltätigkeit zurückzuführen ist. Das Vorhandensein normaler Antikörper gegen das heterophile Antigen würde weiterhin Fragen anregen, die bei den anderen Antikörpern des normalen Serums nicht auftauchen. Während nämlich die bisher bekannten Hämolysine, Bakteriolysine, Agglutinine des normalen Serums nur auf artfremde Antigene wirken, deren Vorhandensein im Organismus des das Serum liefernden Tieres als ausgeschlossen betrachtet werden kann, ist das heterophile Antigen ja gerade durch seine Verbreitung in allen Klassen des Tierreiches ausgezeichnet. Bei dem häufigen Vorkommen von Hammelbluthämolysinen im Serum normaler Tiere, wäre es daher von vornherein gar nicht ausgeschlossen, daß sich Antikörper und Antigen im gleichen Tier vorfinden. Damit wäre aber die Möglichkeit gegeben, beide in ursächliche Beziehung zu bringen und damit zum erstenmal ein wenig Licht über die Entstehung der in ihrer biologischen Bedeutung bisher so dunklen normalen Antikörper zu verbreiten.

Andererseits soll schon hier betont werden, daß die Annahme einer Koexistenz von Antikörper und Antigen im Organismus auf gewisse Schwierigkeiten stößt. Wie in vitro, so müßte auch im Tierkörper eine Absättigung beider Stoffe erfolgen und damit der Nachweis zum mindesten einer der beiden Reaktionskomponenten unmöglich werden. Auch wäre damit zu rechnen, daß diese Reaktion in vivo zu anaphylaktischen Erscheinungen führen könnte, allerdings nicht müßte, da bei langsamem Reaktionsverlauf durch das Dazwischentreten antianaphylaktischer Prozesse die schädlichen Folgen für den Organismus ausgeschaltet werden könnten.

Es wäre daher auch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß zwischen dem Vorhandensein von heterophilem Antikörper und Antigen ein antagonistisches Verhältnis besteht, indem die Existenz des einen — zum mindesten — die Nachweisbarkeit des anderen im gleichen Organismus ausschließt. Die Folgerungen, die aus einem gesetzmäßigen Verhalten in diesem Sinne sich ergeben würden, sollen jedoch erst nach Mitteilung der tatsächlich festgestellten Befunde besprochen werden.

Diese kurzen Erörterungen sollten nur vorausgeschickt werden, um die Fragestellung zu präzisieren und zu zeigen, daß die Auffindung einer Gesetzmäßigkeit im einen oder anderen Sinne — wie ich glaube zum erstenmal — das Vorhandensein resp. Fehlen eines normalen Antikörpers im Serum aus den Beziehungen zu seinem Antigen ableiten ließe, während dies bei den übrigen Normalantikörpern, wie bereits betont wurde, bisher nicht möglich ist. Es würde daraus folgen, daß auch unter physiologischen Verhältnissen, nicht nur unter den künstlichen des Experimentes eine Wechselwirkung von Antikörper und Antigen im Organismus stattfinden kann, und damit den nach der Entdeckung der Cytotoxine so zahlreich unternommenen spekulativen Versuchen, die Cytotoxinlehre für die Pathogenese innerer Erkrankungen heranzuziehen, vielleicht eine gewisse experimentelle Grundlage gewährt werden.

An Beziehungen der heterophilen Amboceptoren zu den Normalamboceptoren hat schon Friedberger gedacht, allerdings in einem Sinne, der einer experimentellen Kritik nicht standhielt. Friedberger zog nämlich den Antigencharakter der heterophilen Organe überhaupt in Zweifel. Aus seinen Versuchen mit Schiff[1]) glaubte er den Schluß ziehen zu dürfen, daß die Entstehung der heterophilen Amboceptoren durch einen unspezifischen Reiz erklärt werden könnte, der durch die Giftigkeit dieser Organe bedingt ist. Nach den Untersuchungen von Dörr und Pick sind aber die von Friedberger und Schiff erzielten Steigerungen des Amboceptorgehaltes zu geringfügig, um mit den außerordentlich wirksamen Forßmannschen Hämolysinen verglichen zu werden. Auch konnten die genannten Autoren die nahen Beziehungen zwischen Giftigkeit und Hämolysinbildungsvermögen der Organe nicht bestätigen. Die Inkubationszeit, die für die Bildung der heterophilen Amboceptoren die gleiche ist, wie für die der isophilen, ferner der von Orudschiew, Sachs und Nathan, Dörr und Pick erbrachte Nachweis der Bindung der heterophilen Amboceptoren durch heterophile Organe in vitro lassen vollends keinen Zweifel,

[1]) l. c.

daß die Entstehung der heterophilen Hämolysine ein wirklicher Immunitätsvorgang ist.

Hingegen hat bereits Forßmann, wie ich nach der Inangriffnahme meiner Untersuchungen festgestellt habe, zum Teil in Gemeinschaft mit Hintze, Versuche mit normalem Kaninchenserum angestellt, aus denen hervorgeht, daß dessen Normalamboceptoren von Meerschweinchenorganen gebunden werden. Da es jedoch bei dem gegenwärtigen Stand unserer Kenntnisse möglich ist, heterophile Amboceptoren durch Heranziehung der verschiedensten heterophilen und nicht heterophilen Antigene schärfer zu charakterisieren, so habe ich auch meine eigenen Versuche mit Kaninchenserum nochmals mitgeteilt.

Durch die zuletzt angeführten Arbeiten ist nämlich die Möglichkeit gegeben, den Charakter von Hammelblutamboceptoren auch dann mit Sicherheit festzustellen, wenn die Art ihrer Entstehung unbekannt ist, wie dies ja für die Normalamboceptoren zutrifft. Zu diesem Zweck stelle ich die in diesen Arbeiten festgestellten Eigenschaften der heterophilen und isophilen Amboceptoren einander gegenüber:

Isophile	Heterophile
lösen: Hammelblut, Ziegenblut, Rinderblut;	lösen: Hammelblut, Ziegenblut;
werden gebunden: vollständig durch Hammelblut, partiell durch Ziegen- und Rinderblut;	werden gebunden durch: Hammelblut, durch die Organe von Meerschwein, Pferd, Katze, Hund, Huhn, Maus, Schildkröte, gekochtes Hammelblut;
sie werden nicht gebunden durch: heterophile Organe.	sie werden nicht gebunden durch: Rinderblut, Organe von Kaninchen, Mensch, Schwein, Rind, Gans, Hammel.

Durch Absorptionsversuche in vitro muß es also möglich sein, festzustellen, ob die Normalamboceptoren zum Typus der heterophilen oder isophilen Amboceptoren gehören.

Die untersuchten Sera stammten vom Kaninchen, Mensch, Schwein, Rind, Meerschwein, Katze, Hund, Pferd.

Als Antigen verwandte ich in den Absorptionsversuchen gekochtes Hammelblut, ferner aus der Gruppe der heterophilen Antigene Meerschweinchen- und Pferdeorgane. Von nicht heterophilen Organen kamen die von Rind, Schwein, Mensch in Anwendung.

Die Versuchsanordnung war in allen Versuchen die folgende: die Sera der untersuchten Tierarten wurden durch $^1/_2$stündiges Erwärmen auf 56° inaktiviert. In einigen besonders angeführten Fällen wurden auch niedrigere Inaktivierungstemperaturen angewendet.

Das gekochte Hammelblut wurde nach der Vorschrift von Sachs und Nathan hergestellt: Gewaschenes Hammelblut wurde mit der doppelten Menge destillierten Wassers digeriert, sodann auf 0,85 % mit Kochsalz besalzen, eine Stunde lang im Wasserbad gekocht und durch ein Drahtnetz geschickt.

Zur Herstellung der Organemulsionen wurden 3 g der Organe abgewogen und mit 15 ccm 0,85%iger NaCl-Lösung in einer Reibschale fein verrieben.

Im Versuch selbst wurden nun 1,5 ccm inaktives Serum und 1,5 ccm Organemulsion gemischt, 45 Minuten bei 37° im Thermostaten gehalten und danach zentrifugiert. Die Abgüsse blieben dann über Nacht im Eisschrank. Zur Kontrolle wurden 1,5 ccm Serum mit 1,5 ccm 0,85%iger NaCl-Lösung versetzt und in der gleichen Weise behandelt. Von den Abgüssen wurden Verdünnungen in je 1 ccm Kochsalzlösung hergestellt, so daß das erste Röhrchen 0,5 ccm, die folgenden 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,016, 0,008 ccm des Abgusses enthalten. Zu diesen Verdünnungen kommt je 1 ccm 5%iges Hammelblut. Um etwa aus den Organen in Lösung gegangene, das Ergebnis trübende antikomplementäre Substanzen auszuschließen, wurden die Röhrchen nach 1stündigem Stehen bei 37° zentrifugiert und die Blutkörperchensedimente unter Komplementzusatz auf die Anwesenheit von Amboceptoren geprüft. Zu diesem Zweck wurden sie mit 3 ccm einer 60fachen Verdünnung von frischem Meerschweinchenserum in 0,85%iger NaCl-Lösung beschickt und durch Schütteln darin verteilt. Ablesung des Resultats nach 2stündigem Aufenthalt im Thermostaten bei 37°.

In einigen Fällen, in denen die Vorprüfung einen sehr geringen Amboceptorgehalt des Serums ergeben hatte, wurden die Organemulsionen vor dem Gebrauch zentrifugiert und das Sediment mit concentriertem Serum versetzt. Diese Fälle sind in den Protokollen besonders aufgeführt, ebenso ist angegeben, wann die Abgüsse sofort nach dem Zentrifugieren geprüft wurden.

Die in den folgenden Protokollen wiedergegebenen Versuchsresultate zeigen nun ganz eindeutig, daß die Hammelblutamboceptoren des Kaninchen-, Menschen- und Schweineserums dem heterophilen Typus ange-

hören. Sie werden quantitativ gebunden von gekochtem Hammelblut, Meerschweinchen- und Pferdeorganen, bleiben hingegen gänzlich unbeeinflußt durch Rinder-, Schweine- und Menschenorgane. Sie stehen daher in keiner Beziehung zu dem artspezifischen Antigen der Hammelbluterythrocyten, sondern nur zu dem in ihnen enthaltenen heterophilen Antigen.

Im Zusammenhang damit ist es interessant, daß die Sera der genannten Tierarten Normalhämolysine für Rinderblut nicht besitzen. Für das Kaninchenserum war dies bekannt, für die anderen Sera habe ich dies in besonderen Versuchen festgestellt. Ein solches Verhalten war durchaus nicht notwendigerweise zu erwarten, denn es wäre ja möglich gewesen, daß die Sera neben den heterophilen Amboceptoren und ganz unabhängig davon Rinderblutamboceptoren besitzen. Deren völliges Fehlen ist aber jedenfalls ein weiterer Beweis für die Zugehörigkeit der angeführten Amboceptoren zum heterophilen Typus.

Die Untersuchung der anderen Tiersera zeigt aber, daß diesem Befund allgemeine Gültigkeit nicht zukommt. Zunächst fand sich eine Reihe von Tieren, deren Sera überhaupt Hammelblutamboceptoren nicht in ausreichenden Mengen enthielten. In diese Gruppe gehören das Meerschweinchen- und Katzenserum. Auch das Pferdeserum wurde in den meisten Fällen frei von Hammelblutamboceptoren gefunden. Nur in einem Fall war ein Absorptionsversuch ausführbar, und dieser ergab, daß die Hammelblutamboceptoren von Meerschweinchenorganen nicht gebunden wurden. Noch deutlicher war dies Verhalten beim Hundeserum, dessen bisweilen recht kräftig wirksame Hammelbluthämolysine durch heterophile Organe nicht gebunden werden. Es ergibt sich also, daß Meerschweinchen- und Katzenserum Hammelbluthämolysine nicht enthalten und daß die Hämolysine des Pferde- und Hundeserums, wenn sie vorhanden sind, dem isophilen Typus angehören.

Beim Rinderserum ergaben sich in den einzelnen Versuchen nicht übereinstimmende Resultate, die einer Erklärung vorläufig nicht zugänglich sind. Vor allem dürfte dies für die in einzelnen Versuchen beobachtete Bindung der Hammelbluthämolysine des Rinderserums durch nicht heterophile Organe

zutreffen. Eine eingehendere Diskussion dieser Versuche findet sich in den Protokollen.

Die Tierarten, deren Sera untersucht wurden, zerfallen also in zwei Gruppen, deren eine (Kaninchen, Mensch, Schwein) heterophile Amboceptoren besitzt, während bei der anderen (Meerschwein, Katze, Hund, Pferd) gar keine Hammelbluthämolysine oder nur isophile Amboceptoren vorkommen. Ein Vergleich mit den in der Einleitung genauer besprochenen Versuchen von Forßmann, Dörr und Pick, Orudschiew u. a. ergibt nur, daß die gleiche Gruppierung entsteht, wenn die Tiere nach dem Vorhandensein heterophilen Antigens in ihren Organen geordnet werden, und zwar besitzen die Tiere mit heterophilen Organen (Meerschwein, Katze, Hund, Pferd) keine heterophilen Amboceptoren, während umgekehrt das Vorhandensein von heterophilen Amboceptoren (Kaninchen, Mensch, Schwein) den Nachweis heterophiler Antigene in den Organen ausschließt. Zwischem dem Vorhandensein heterophiler Antikörper und Antigene besteht also in der Tat ein antagonistisches Verhalten[1]).

Bei dem Versuch einer Erklärung dieser überraschenden Gesetzmäßigkeit werden wir uns der Möglichkeit nicht verschließen können, daß es sich hier um Regulationen handelt, die im Organisationsplan des Tierkörpers bereits als Anlagen vorhanden sind und als solche sich natürlich einer eingehenderen Analyse völlig verschließen. Wir müßten uns dann mit der Annahme eines schon von Ehrlich angenommenen horror autotoxicus begnügen, der mehr eine Umschreibung als eine Erklärung der Tatsachen darstellt. Abgesehen davon, daß eine solche Auffassung wenig befriedigend wäre, stößt sie aber auch

[1]) Wie Dörr und Pick bereits gefunden haben, lassen sich bei Tieren mit heterophilem Organsystem durch Injektion heterophiler Organe keine Hammelbluthämolysine erzeugen. Dieser Befund läßt jedoch auf das Verhalten der Normalhämolysine noch keine Schlüsse ziehen. Denn es wäre ja möglich, daß durch das Vorhandensein heterophiler Antigene das Bildungsvermögen des Organismus für heterophile Amboceptoren bereits maximal in Anspruch genommen ist, so daß eine weitere künstliche Steigerung nicht zu erzielen wäre.

bei konsequenter Durchführung auf Schwierigkeiten. Denn nehmen wir an, daß die Anlagen für das Antigen und den Antikörper unabhängig voneinander gebildet werden, so wäre nicht zu verstehen, warum zwischen ihnen eine so feste Gesetzmäßigkeit bestehen sollte. Eine Wechselwirkung wäre zwischen ihnen aber nur denkbar, wenn sie bereits vorhanden sind, und wir werden so zu dem Schluß gedrängt, daß sich das von uns beobachtete antagonistische Verhalten erst sekundär herausbildet, nachdem die Anlagen bereits gegeben sind.

Die Ausbildung der tatsächlich beobachteten Verhältnisse würde sich am einfachsten unter der Annahme erklären lassen, daß primär das heterophile Antigen in den Organen aller Tierarten vorhanden ist. Bei der dann einsetzenden Bildung heterophiler Amboceptoren erfolgt nun eine Reaktion zwischen Antikörper und Antigen, bei der beide Reaktionskomponenten zum Teil verbraucht, vielleicht zerstört werden. Von der Menge des vorhandenen Antigens einerseits, von der Intensität der Antikörperbildung andererseits wird es abhängen, welche der Komponenten nach der Reaktion im Überschuß zurückbleibt. Bei reichlich vorhandenem Antigen und schwacher Antikörperbildung werden sich die Verhältnisse herausbilden, denen wir beim Meerschweinchen, der Katze, dem Hund und dem Pferd begegnet sind. Ist umgekehrt die Antikörperbildung kräftig, die Menge des heterophilen Antigens gering, so wird dieses für den experimentellen Nachweis verschwinden, die Antikörper werden im Serum übrig bleiben, wie wir dies beim Kaninchen, Menschen und Schwein gefunden haben.

Auf ganz anderem Wege gelangten Bail[1]) und Margulies zu sehr interessanten Resultaten, die ich als eine experimentelle Stütze der im vorigen ausgesprochenen Annahmen ansehen möchte. Diese Autoren glauben nämlich auf Grund ihrer Versuche in dem Bindegewebe den Sitz des heterophilen Antigens suchen zu müssen, und da sie dieses für artspezifisch wenig differenziert halten, so gelangen auch sie zu der Vermutung, daß das verschiedene Verhalten der Organe bei den einzelnen Tierarten nicht primär in den Eigenschaften dieser Organe begründet ist, sondern auf eine sekundäre Einwirkung des

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 19, 185.

Serums zurückgeführt werden muß. Um diese Annahme zu prüfen, digerierten sie die Organe von Meerschweinchen und Pferd mit dem Serum von Kaninchen, Mensch, Rind, Schwein, Schaf und stellten fest, daß nach diesem Eingriff in der Tat das Bindungsvermögen für Hammelbluthämolysine verloren gegangen ist. Es muß also im Serum dieser Tiere ein Stoff vorhanden sein, der das heterophile Antigen bindet resp. zerstört. Allerdings glauben Bail und Margulies die Annahme ablehnen zu müssen, daß dieser Stoff mit dem normalen Hammelbluthämolysin dieser Sera identisch ist. Sie fanden nämlich, daß der Hämolysingehalt der Sera nach dem Absorptionsversuch nur sehr wenig abgenommen hatte. Sieht man aber die Versuchsprotokolle genauer durch, so scheint dieses Argument wenig Beweiskraft zu besitzen. Einmal verwandten Bail und Margulies sehr geringe Organmengen, so daß die Absorption schon von vornherein nur eine geringfügige sein konnte. Sodann kann aber die übliche Art, in der Absorptionsversuche ausgeführt werden, überhaupt leicht zu Täuschungen über die Menge der absorbierten Substanz Anlaß geben. Wenn die Abgüsse in abfallenden Mengen austitriert werden, die stets um $100\,^0/_0$ voneinander verschieden sind, so bedeutet eine Verschiebung der Titergrenze um nur ein Röhrchen schon eine Absorption von $50\,^0/_0$ der Substanz. In einem von den Autoren mitgeteilten Versuch findet aber beim Austitrieren der Abgüsse sogar ein Sprung von 0,5 auf 0,1, also um $500\,^0/_0$, statt. Daß die Hammelbluthämolysine von den Meerschweinchen- und Pferdeorganen nicht gebunden werden, ist also durch die Angaben von Bail und Margulies nicht erwiesen, im Gegenteil zeigen die in meiner eigenen Arbeit mitgeteilten Resultate mit aller Sicherheit, daß die Bindung tatsächlich eintritt und nur infolge der von den Autoren gewählten Methodik dem Nachweis entgangen ist.

Damit soll natürlich nicht behauptet werden, daß der Stoff, welcher die beobachtete Veränderung der Meerschweinchenorgane bewirkt, nun wirklich das Normalhammelbluthämolysin sein muß. Diese Frage, die nur durch weitere Versuche entschieden werden könnte, tritt aber auch an Bedeutung zurück hinter dem Nachweis, daß überhaupt die heterophilen Organe durch die Sera von Tieren der Kaninchengruppe unwirksam

gemacht werden können. Denn danach ist der von mir auf Grund meiner eigenen Versuche gemachte Schluß durchaus berechtigt, daß auch bei jenen Tieren, deren Serum Hammelbluthämolysine enthält, das heterophile Antigen primär in den Organen vorhanden ist. Damit wäre aber die Möglichkeit gegeben, die Entstehung der normalen Hammelbluthämolysine in der gleichen Weise wie die der Immunhämolysine durch den Reiz seines zugehörigen Antigens zu erklären, und für eines der rätselvollsten Probleme der Immunitätslehre eine sehr einfache Lösung in Aussicht gestellt.

Bei der Wichtigkeit, die das Problem der normalen Antikörper für die Theorie der Immunitätsvorgänge besitzt, werden natürlich noch weitere experimentelle Prüfungen der aufgeworfenen Fragen erwünscht sein. Aufschlüsse wird vielleicht die Untersuchung fötaler Organe bringen, da ja die Bildung der normalen Antikörper teilweise erst während des extrauterinen Lebens erfolgt und möglicherweise beim Fötus noch die primären Verhältnisse in den Organen anzutreffen sind. Doch ist mein experimentelles Material in dieser Richtung noch nicht ausreichend, um daraus Schlüsse zu ziehen.

Jedenfalls haben die mitgeteilten Versuchsergebnisse gezeigt, daß auf dem beschrittenen Wege mancherlei Aufschlüsse über das Vorkommen normaler Hämolysine bei den verschiedenen Tierspezies zu gewinnen sind, die nach dem bisherigen Stand unserer Kenntnisse nicht zu erwarten waren. Nicht nur konnte der Gehalt des Serums an heterophilen Amboceptoren in gesetzmäßige Beziehung zum Antigengehalt der Organe gebracht werden; auch das Vorkommen von Amboceptoren für Rinderblut erwies sich als in einem gewissen Zusammenhang mit den Hammelbluthämolysinen stehend. Im folgenden möchte ich nun noch einige Beobachtungen mitteilen, die den Gedanken nahelegen, daß auch individuelle Differenzen menschlicher Sera mit den in dieser Arbeit behandelten Verhältnissen im Zusammenhang stehen könnten.

Im Jahre 1901 hatte ich Gelegenheit, auf Anregung von Herrn Prof. E. Neißer hämolytische Untersuchungen an dem Krankenmaterial des städtischen Krankenhauses in Stettin an-

zustellen. Diese Versuche verfolgten den Zweck, Beziehungen des Hämolysingehaltes des Menschenserums zu den verschiedensten Erkrankungen aufzusuchen, um auf diesem Wege vielleicht die Serologie diagnostischen Zwecken zugänglich zu machen. Als Blutart kamen Kaninchenblutkörperchen zur Anwendung. In vielen Hunderten von Untersuchungen stellte sich aber damals heraus, daß der Titer des Menschenserums für Kaninchenblut unter den gleichen Versuchsbedingungen ein absolut konstanter war. Ganz im Gegensatz hierzu steht nun das Verhalten des Menschenserums gegenüber Hammelblutkörperchen. Herr Dr. Dünner hat auf meine Veranlassung 60 Menschensera nach dieser Richtung untersucht und gefunden, daß der Titer in den weitesten Grenzen schwankt. Neben Sera, die Hammelblut überhaupt nicht lösten, fanden sich solche, die noch in der Menge von 0,004 ccm komplette Hämolyse von 1 ccm 5%igem Hammelblut bewirkten, und dazwischen fanden sich alle möglichen Übergänge. Auch der hämolytische Titer des Kaninchenserums für Hammelblut ist nach meinen Untersuchungen bei den verschiedenen Tieren ein sehr schwankender. Dieses dem Kaninchenblut ganz entgegengesetzte Verhalten des Hammelbluts scheint mir sehr bemerkenswert zu sein, und möglicherweise mit den Beziehungen der Hammelbluthämolysine zum heterophilen Antigen im Zusammenhang zu stehen. Denn es ist ohne weiteres verständlich, daß die Beziehungen zwischen den Hammelbluthämolysinen und dem heterophilen Antigen nicht bei allen Tieren derselben Spezies genau die gleichen seien und dadurch ein sehr verschiedenes Blutbild bedingen werden.

A. Versuche mit Kaninchenserum.

I. Absorption mit gekochtem Hammelblut.

Versuchsanordnung s. oben.

	Kaninchenserum A		Kaninchenserum B		Kaninchenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	0	komplett	stark	komplett	0?	komplett
0,25	0	„	0?	„	0	„
0,125	0	„	0	stark	0	„
0,062	0	stark	0	Spur	0	stark
0,031	0	wenig	0	0	0	deutlich
0,016	0	Spur	0	0	0	Spur
0,008	0	0	0	0	0	0

II. Absorption mit Meerschweinchenniere.

Versuchsanordnung s. oben.

	Kaninchenserum A		Kaninchenserum B		Kaninchenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	0	komplett	0	komplett	0	komplett
0,25	0	„	0	„	0	„
0,125	0	fast kompl.	0	fast kompl.	0	„
0,062	0	deutlich	0	stark	0	stark
0,031	0	wenig	0	deutlich	0	deutlich
0,016	0	Spur	0	wenig	0	wenig
0,008	0	0?	0	Spur	0	Spur

III. Absorption mit Pferdeniere.

Versuchsanordnung s. oben.

	Kaninchenserum A		Kaninchenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	0	komplett	0	komplett
0,25	0	„	0	„
0,125	0	„	0	„
0,062	0	deutlich	0	fast komplett
0,031	0	wenig	0	wenig
0,016	0	0	0	Spur
0,008	0	0	0	0?

IV. Absorption mit Rinderleber.

Versuchsanordnung s. oben.

	Kaninchenserum A		Kaninchenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	„	„
0,125	„	„	„	„
0,062	deutlich	stark	„	„
0,031	Spur	Spur	stark	stark
0,016	0	0	Spur	Spur
0,008	0	0	0	0

V. Absorption mit Schweineleber.

Versuchsanordnung s. oben.

	Kaninchenserum A		Kaninchenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	„	„
0,125	„	„	„	„
0,062	wenig	stark	„	deutlich
0,031	Spur	wenig	Spur	0?
0,016	0	Spur	0	0
0,008	0	0	0	0

VI. Absorption mit Menschenniere.

Versuchsanordnung s. oben.

	Kaninchenserum A		Kaninchenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	„	„
0,125	„	„	„	„
0,062	stark	fast komplett	fast komplett	„
0,031	wenig	wenig	deutlich	stark
0,016	Spur	Spur	Spur	wenig
0,008	0	0	0	Spur

Die Versuche zeigen in eindeutiger Weise, daß die Hammelblutamboceptoren des normalen Kaninchenserums durch gekochtes Hammelblut, Meerschweinchen- und Pferdeniere vollständig oder fast vollständig absorbiert werden, nicht hingegen durch Rinderleber, Schweineleber und Menschenniere. Die Normalamboceptoren des Kaninchenserums verhalten sich also im Absorptionsversuch vollkommen wie die immunisatorisch erzeugten heterogenetischen Amboceptoren.

B. Versuche mit Menschenserum.

I. Absorption mit gekochtem Hammelblut.

Versuchsanordnung s. oben.

	Menschenserum A		Menschenserum B		Menschenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	fast kompl.	komplett	0	wenig	Spur	komplett
0,25	stark	„	0	0	0	„
0,125	wenig	„	0	0	0	deutlich
0,062	0	„	0	0	0	wenig
0,031	0	fast kompl.	0	0	0	0
0,016	0	wenig	0	0	0	0
0,008	0	Spur	0	0	0	0

II. Absorption mit Meerschweinchenniere.

Versuchsanordnung s. oben.

	Menschenserum A		Menschenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	Spur	komplett	0	komplett
0,25	0	„	0	„
0,125	0	„	0	„
0,062	0	„	0	deutlich
0,031	0	„	0	wenig
0,016	0	„	0	—
0,008	0	wenig	0	0

III. Absorption mit Pferdeniere.

Versuchsanordnung s. oben.

	Menschenserum A		Menschenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	0	komplett	0	komplett
0,25	0	„	0	stark
0,125	0	„	0	wenig
0,062	0	stark	0	Spur
0,031	0	deutlich	0	„
0,016	0	wenig	0	„
0,008	0	0	0	„

IV. Absorption mit Rinderleber.

Versuchsanordnung s. oben.

	Menschenserum A		Menschenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	„	„
0,125	„	„	„	deutlich
0,062	„	„	stark	0
0,031	fast komplett	Spur	0	0
0,016	0	0	0	0
0,008	0	0	9	0

V. Absorption mit Schweineleber.

Versuchsanordnung s. oben.

	Menschenserum A		Menschenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	„	„
0,125	„	„	fast komplett	fast komplett
0,062	„	„	0?	Spur
0,031	stark	„	0	0
0,016	0	Spur	0	0
0,008	0	„	0	0

VI. Absorption mit Menschenniere.

Versuchsanordnung s. oben.

	Menschenserum A		Menschenserum C	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
0,5	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	„	„	wenig	deutlich
0,125	„	„	Spur	Spur
0,062	deutlich	stark	0	0
0,031	Spur	Spur	0	0
0,016	0	0	0	0
0,008	0	0	0	0

Ergebnis: Auch die Hammelbluthämolysine des normalen Menschenserums sind als heterophile Antikörper anzusehen.

C. Versuche mit Rinderserum.

I. Absorption mit Meerschweinchen- und Menschenniere.

Da der Amboceptorgehalt des Rinderserums für Hammelblut ein verhältnismäßig geringer ist, so wurde in diesem Versuch das Sediment von 3 ccm der Organemulsion (1 Gewichtsteil Organ auf 5 ccm 0,85%iger NaCl-Lösung) mit 3 ccm des $^1/_2$ Stunde auf 56° erwärmten Rinderserums versetzt und durch Schütteln darin verteilt. Sonst die gleiche Versuchsanordnung wie in den früheren Versuchen.

I.

	Meerschweinchenniere		Menschenniere	
	Abguß	Kontrolle	Abguß	Kontrolle
1	0	komplett	fast komplett	komplett
0,5	0	„	deutlich	„
0,25	0	fast komplett	wenig	fast komplett
0,125	0	deutlich	0	wenig
0,062	0	0	0	0
0,031	0	0	0	0

Wie nach den bisherigen Ergebnissen zu erwarten war, wurden die Hammelblutamboceptoren durch Meerschweinchenniere vollständig absorbiert. Aber auch die Menschenniere hat eine, wenn auch schwächere, so doch deutliche Abnahme des Amboceptorgehaltes herbeigeführt, ein Resultat, das bei dem Fehlen Forßmannscher Receptoren in den Organen des Menschen zunächst nicht erklärt werden konnte. Es wurde deshalb der folgende Versuch mit Rinderleber, Schweineleber und Pferdeniere angestellt.

II. Absorption mit Rinderleber, Schweineleber und Pferdeniere angestellt.

Versuchsanordnung s. vorigen Versuch.

	Rinderleber	Schweineleber	Pferdeniere	Kontrolle
1,	0	0	0	komplett
0,5	0	0	0	fast komplett
0,25	0	0	0	wenig
0,125	0	0	0	0
0,062	0	0	0	0
0,031	0	0	0	0

Auch in diesem Versuch vermag die Pferdeniere die Amboceptoren an sich zu reißen, aber auch Rinder- und Schweineleber, die keine Forßmannschen Receptoren besitzen, absorbieren vollständig die Hammelbluthämolysine. Da in diesem Versuch die Versuchsanordnung gegenüber den früheren etwas geändert war, so wurde zunächst nochmals ein Versuch mit Menschenserum und Menschenniere unter genau den gleichen Versuchsbedingungen ausgeführt.

III. Absorption von Menschenserum durch Menschenniere.

Das Sediment von 3 ccm der Menschennierenemulsion (1 Teil Niere auf 5 Teile 0,85%ige NaCl-Lösung) wird mit 3 ccm $^1/_2$ Stunde auf 56° erwärmten Menschenserums versetzt, 45 Minuten bei 37° im Thermostaten nach dem Zentrifugieren bis zum folgenden Tag im Eisschrank gehalten.

	Abguß	Kontrolle
1	komplett	komplett
0,5	„	„
0,25	„	„
0,125	fast komplett	„
0,062	wenig	fast komplett
0,031	0	wenig

Tatsächlich wird bei dieser Versuchsanordnung, bei der konzentriertes Serum auf das Organsediment einwirkte, eine geringe Menge Amboceptor auch aus Menschenserum durch Menschenniere absorbiert. Doch ist diese Absorption zu geringfügig, um die Ergebnisse beim Rinderserum allein durch die Methodik zu erklären.

In dem folgenden Versuch wurde nun die Versuchsanordnung in einigen Punkten abgeändert. Die Abgüsse von den Organsedimenten blieben nicht bis zum folgenden Tag im Eisschrank, sondern wurden am gleichen Tage austitriert. Die mit diesen Abgüssen sensibilisierten Hammelblutkörperchen wurden vor dem Komplementzusatz noch einmal mit 0,85%iger NaCl-Lösung gewaschen, um etwaige aus den Organen stammende Hemmungsstoffe gründlich zu entfernen. Im übrigen wirkten auch in diesen Versuchen 3 ccm konzentriertes Rinderserum auf die Organsedimente ein.

IV. Absorption mit Menschen-, Meerschweinchen- und Pferdeniere, Rinderleber und Schweineleber.

	Meerschweinchenniere	Pferdeniere	Menschenniere	Rinderleber	Schweineleber	Kontrolle
1	0	0	komplett	komplett	komplett	komplett
0,5	0	0	„	„	„	„
0,25	0	0	fast kompl.	„	„	„
0,125	0	0	wenig	wenig	wenig	wenig
0,062	0	0	Spur	Spur	Spur	Spur

Dieser Versuch ergibt wieder das von der Theorie geforderte Verhalten, indem Meerschweinchen- und Pferdeniere absorbieren, Menschenniere, Rinderleber und Schweineleber unwirksam sind. Weitere Versuche ergeben jedoch, daß auch bei genauester Innehaltung der in diesem Versuch angegebenen Arbeitsbedingungen die Resultate nicht übereinstimmend ausfallen.

In dem folgenden Versuch wurde ein neues Rinderserum verwandt, das nur bei Meerschweinchenniere eine ganz geringfügige Absorption zeigte (Versuch V). Das 1 Tag alte Serum verhielt sich noch ebenso (Versuch VI); als jedoch das gleiche Serum nach 4 Tagen untersucht wurde, bewirkten sämtliche Organe mit Ausnahme der Rinderniere komplette Absorption (Versuch VII). Nach 7tägigem Stehen im Eisschrank hatte sich das Rinderserum wiederum verändert; denn nunmehr trat eine Absorption überhaupt nicht mehr ein, mit Ausnahme des Versuchs mit Schweineniere, die im ersten Versuch ganz unwirksam gewesen war (Versuch VIII).

V. Absorption mit frischem Serum.

	Meerschweinchenniere	Schweineleber	Rinderleber	Menschenniere	Kontrolle
1	komplett	komplett	komplett	komplett	komplett
0,5	„	„	„	„	„
0,25	„	„	„	„	„
0,125	stark	„	„	„	„
0,062	Spur	fast kompl.	fast kompl.	stark	stark

VI. Absorption mit 1tägigem Serum.

	Meerschweinchenniere	Menschenniere	Kontrolle
1	fast komplett	komplett	komplett
0,5	stark	„	„
0,25	fast komplett	fast komplett	„
0,125	0	0	Spur?
0,062	0	0	0

VII. Absorption mit 4tägigem Serum.

	Meerschweinchenniere	Pferdeniere	Rinderniere	Schweineniere	Kontrolle
1	0	0	komplett	0	komplett
0,5	0	0	„	0	„
0,25	0	0	„	0	„
0,125	0	0	„	0	„
0,062	0	0	wenig	0	stark

VIII. Absorption mit 7tägigem Serum.

	Meerschweinchenniere	Pferdeniere	Menschenniere	Rinderniere	Schweineniere	Kontrolle
1	komplett	komplett	komplett	komplett	fast kompl.	komplett
0,5	„	„	„	„	0	„
0,25	„	„	„	„	0	„
0,125	„	„	„	„	0	„
0,062	fast kompl.	fast kompl.	„	sehr stark	0	„

Ein Überblick über die Rinderserumversuche läßt die Konstanz der Kaninchenserum- und Menschenserumversuche vermissen. Verschiedene Rindersera und das gleiche Rinderserum, zu verschiedenen Zeiten untersucht, geben ganz ungleiche Resultate. Versuch IV zeigt allerdings vollständige Übereinstimmung mit den Kaninchen- und Menschenserumexperimenten. In Versuch V wird überhaupt keine Absorption beobachtet, und in den anderen Versuchen steht sie in keiner gesetzmäßigen Beziehung zu dem Gehalt der Organe an Forßmannschen Receptoren. Die Aufklärung dieser Unregelmäßigkeiten wird weitere Versuche notwendig machen, die besonders über den spezifischen Charakter der Absorption durch Menschen-, Rinder- und Schweineorgane entscheiden

müssen. An dieser Stelle sei nur auf Versuche von Dörr und Pick hingewiesen, die zu den angeführten Ergebnissen in Beziehung zu stehen scheinen. Diese Autoren untersuchten nach den aus der Forßmannschen Entdeckung sich ergebenden Gesichtspunkten die primäre Antiserumanaphylaxie. Sie kamen dabei in Übereinstimmung mit Forßmann und Hintze, Sachs und Nathan zu dem Resultat, daß die Giftigkeit gewisser Immunsera für Meerschweinchen auf ihrem Gehalt an heterophilen Amboceptoren beruht, die mit den heterophilen Receptoren der Meerschweinchenorgane unter Ablauf eines anaphylaktischen Choks reagieren. Im Anschluß hieran suchten sie nun auch die toxische Wirkung gewisser Normalsera zu analysieren und prüften zu diesem Zweck die Absorbierbarkeit des toxischen Prinzips im Rinderserum. Es ergab sich, daß dieses nicht durch Hammel-, Meerschweinchen- und Hühnererythrocyten, wohl aber durch die verriebenen Organe des Meerschweinchens, des Pferdes, des Kaninchens und des Huhnes gebunden wird. Wenn auch nach der berechtigten Meinung der Autoren Zweifel an der Identität des toxischen Prinzips der Normalsera mit den heterophilen Normalamboceptoren für Hammelblut vorläufig durchaus geboten sind, so ist es doch auffallend, daß auch in diesen Versuchen mit Rinderserum die nicht heterophilen Kaninchenorgane sich als bindungsfähig erwiesen.

D. Versuche mit Schweineserum.

Äußerer Schwierigkeiten wegen konnte leider nur ein Versuch mit Schweineserum angestellt werden, doch rechtfertigt das völlig eindeutige Resultat seine Wiedergabe.

I.

Versuchsanordnung s. frühere Versuche.

	Meerschweinchenniere	Menschenniere	Schweineleber	Rinderleber	Kontrolle
0,5	wenig	komplett	komplett	komplett	komplett
0,25	0	„	„	„	„
0,125	0	„	„	„	„
0,062	0	„	stark	„	„
0,031	0	mäßig	Spur	wenig	mäßig
0,016	0	Spur	0	0	Spur

Auch die Hammelblutamboceptoren des Schweineserums sind demnach heterophile Amboceptoren.

E. Versuche mit Meerschweinchenserum.

Bei zahlreichen Vorprüfungen konnte ich keine Meerschweinchensera finden, die zur Anstellung des Absorptionsversuches genügende Mengen von Hammelblutamboceptoren enthielten. Weitaus die Mehrzahl der Sera löste Hammelblut überhaupt nicht oder in so geringem Grade, daß ein Versuch nicht durchführbar war. Diese Befunde stimmen mit den Erfahrungen von Tsuneoka überein, stehen hingegen in einem gewissen Gegensatz zu den Angaben von Dörr und Pick. Zur Klärung dieser Frage werden daher noch weitere Versuche erforderlich sein.

F. Versuche mit Katzenserum.

Auch im Katzenserum konnten Hämolysine für Hammelblut nicht nachgewiesen werden.

G. Versuche mit Hundeserum.

Die folgenden Versuche wurden mit den Sera von 3 verschiedenen Hunden angestellt.

Versuch 1.

Je 3 ccm des $^1/_2$ Stunde bei 51° inaktivierten Hundeserums werden mit dem Sediment von 3 ccm einer Organemulsion 1:5 versetzt. Nach 1stündigem Stehen bei 37° wird zentrifugiert. Die Abgüsse wirken in den angegebenen Verdünnungen auf je 0,5 ccm 5%iges Hammelblut ein. Nach einem Aufenthalt von 40 Minuten im Thermostaten von 37° wird zentrifugiert. Die Sedimente werden mit 0,15 ccm frischem Meerschweinchenserum versetzt und mit 0,85%iger Kochsalzlösung auf das Volumen von 2 ccm gebracht. Ablesung des Resultats nach 2stündigem Verweilen bei 37°.

Versuch 1.

	Meerschweinchenniere	Menschenniere	Rinderniere	Kontrolle
1	komplett	komplett	komplett	komplett
0,5	„	„	„	„
0,25	„	„	„	„
0,125	„	„	„	„
—	Spur	—	—	—

Versuch 2.

Versuchsanordnung s. oben.

	Meerschweinchenniere	Menschenniere	Rinderniere	Kontrolle
1	fast komplett	komplett	wenig	komplett
0,5	wenig	Spürchen	Spürchen	„
0,25	0	0	0	Spur
0,125	0	0	0	0
—	0	—	—	—

Versuch 3.

Versuchsanordnung s. oben.

	Meerschweinchenniere	Menschenniere	Rinderniere	Kontrolle
1	komplett	komplett	komplett	komplett
0,5	stark	fast komplett	stark	fast komplett
0,25	Spur	mäßig	Spur	stark
0,125	Spürchen	Spur	Spürchen	Spur
—	0	—	—	—

Resultat: In Versuch 1 und 3 ist eine irgendwie beträchtliche Absorption nicht zu beobachten. Hingegen ist in Versuch 2 die Hämolyse in den drei ersten Kolonnen deutlich geringer als in der Kontrolle. Eine Beziehung zu den Forßmannschen Receptoren ist jedoch auch in diesen Versuchen nicht vorhanden. Es geht dies schon daraus hervor, daß die Rinderniere, die heterophile Receptoren nicht enthält, am meisten absorbiert. Ich möchte daher annehmen, daß vorläufig nicht zu analysierende Faktoren vielleicht unspezifischer Natur das Resultat beeinflußt haben. In dieser Annahme werde ich durch die Tatsache bestärkt, daß gerade das Hundeserum II an sich einen sehr geringen hämatolytischen Titer aufweist und daher wohl gegen alle antihämolytischen Einflüsse besonders empfindlich sein dürfte. Das verhältnismäßig starke Absorptionsvermögen der Rinderniere läßt sich vielleicht am einfachsten durch deren unvermeidlichen Gehalt an roten Blutkörperchen erklären, die bei ihrer Verwandtschaft mit dem Hammelblut sehr wohl imstande sein könnten, die Hammelbluthämolysine des Hundeserums wenigstens partiell zu binden.

Die Gesamtheit dieser drei Versuche zeigt jedenfalls, daß sich eine Zugehörigkeit des Hundeserums

zum Typus der heterophilen Amboceptoren nicht erweisen läßt.

H. Versuche mit Pferdeserum.

Die meisten Pferdesera enthalten, wie durch zahlreiche Versuche festgestellt wurde, keine Hämolysine für Hammelblut. Ein Absorptionsversuch konnte daher nur mit einem Serum angestellt werden.

3 ccm Pferdeserum wurden mit dem Sediment von 3 ccm Meerschweinchennierenemulsion 1 : 5 versetzt.

Versuchsanordnung s. frühere Versuche.

	Abguß	Kontrolle
1	deutlich	komplett
0,5	stark	fast komplett
0,25	deutlich	deutlich
0,125	Spur	wenig
0,062	0	0
0,031	0	0

In den ersten Röhrchen ist nach Absorption eine geringfügige Verminderung der Hämolyse zu beobachten. Die untere Grenze ist jedoch nicht verändert.

Über Fermentbildung.

II. Mitteilung.

Von

Martin Jacoby.

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 9. Januar 1917.)

In der ersten Mitteilung[1]) meiner Studien „Über Fermentbildung" habe ich gezeigt, daß neben dem Traubenzucker, der Galaktose und einigen ihm nahestehenden Kohlenhydraten insbesondere das Glycerin und andere ihm verwandte Substanzen der 3-Kohlenstoffreihe als Bausteine für die Fermentbildung in den Zellen in Betracht kommen.

Die klaren Resultate dieses ersten Versuches, die Bausteine, aus denen die Zellen ihre Fermente bilden, aufzufinden, machten mir Mut, den eingeschlagenen Weg weiter zu verfolgen. Wenn ich auch keineswegs die noch zu überwindenden Schwierigkeiten unterschätze, so scheint mir es doch durchaus notwendig, energisch dem klar erkennbaren Ziele zuzustreben, da für geraume Zeit der Weg gebahnt und nicht mehr zu verfehlen ist.

Zwei Wege scheinen zur Auswahl gegeben zu sein. Einmal könnte man weiter nach Substanzen oder Substanzgruppen suchen, die ähnlich wie die Gruppe des Traubenzuckers oder des Glycerins die Fermentbildung steigern, die an und für sich in einem Medium von unbekannter Konstitution vor sich geht. Der zweite Weg ist, daß man die Bakterienzellen in einem Nährboden von durchaus chemisch bekannter Zusammensetzung sich entwickeln läßt und nun prüft, was man diesem Nährboden zufügen muß, damit die Fermentbildung in Gang kommt.

Den zweiten Weg habe ich eingeschlagen, weil mir hier das Vorwärtsschreiten weniger vom Zufall abhängig erscheint.

[1]) Diese Zeitschr. 79.

Ich teile die ersten hier gewonnenen Ergebnisse schon mit, da man auf dem schwierigen Gebiete nur schrittweise vorwärtskommen kann.

Für die dieser Mitteilung zugrunde liegenden Versuche wurden dieselben Bakterien benutzt, die wir bisher stets als harnstoffspaltende Bakterien verwandt haben. Die Bakterien wurden andauernd auf Bouillon weitergezüchtet und zeigten stets die ungefähr gleiche energische Fähigkeit der Harnstoffspaltung.

Die Herstellung der Nährbouillon war die allgemein übliche: 1 kg von Fett und Sehnen befreites, klein geschnittenes Pferdefleisch wird mit 2 l Wasser übergossen und einen Tag stehen gelassen. Dann preßt man alles durch eine Fleischpresse und filtriert den Saft ab. Man kocht ihn 1 Stunde, gibt nach dem Abkühlen 1 % Pepton und 0,5 % Kochsalz zu, läßt wiederum 1 Stunde kochen, stellt nach dem Abkühlen mit 10 %iger Sodalösung schwach alkalische Reaktion her. Nach nochmaligem ½stündigem Kochen wird nochmals die Reaktion geprüft, die Lösung filtriert und in üblicher Weise sterilisiert.

Diese Bouillon stellt ein Gemisch von mannigfachen chemischen Verbindungen dar. Sie ist für uns nur insofern von Interesse, als wir wissen, daß sie einen ausgezeichneten Nährboden für die Bakterien darstellt und die Substanzen enthält, die die Bakterien für die Fermentbildung gebrauchen.

Zunächst können wir kurz über Versuche berichten, in denen wir die Fermentbildung bei Bakterien studierten, die wir auf einer Bouillon gezüchtet hatten, die auf 100 Teile Bouillon 1 g Traubenzucker enthielt. Wenn wir derartige Bakterien im Versuch mit Harnstoff zusammenbrachten, so erhielten wir ausgezeichnete Spaltung. Da aber nicht auszuschließen war, daß wir mit den Bakterien noch genügend Zucker in die Versuchslösung brachten, so mußten wir den Kontrollen so viel einer 1 %igen Traubenzuckerbouillon zusetzen, wie wir mit den Bakterien zusammen zum Versuch genommen hatten. Wie wir auf Grund der früheren Resultate erwarten mußten, zeigten dann aber auch die Kontrollen eine sehr starke Fermentbildung, so daß also so keine Unterschiede feststellbar waren.

Wir gingen dann dazu über, die Bakterien von der Bouillon auf Nährböden von bekannter Zusammensetzung überzuimpfen. Die meisten Versuche stellten wir mit dem von Uschinski

angegebenen Nährboden an, dem wir in einem Teil der Versuche noch ein Eisensalz zufügten. Wir bezeichnen den Nährboden dann als Eisennährboden.

Den Uschinski-Nährboden[1]) stellten wir uns her, indem wir in 200 ccm destillierten Wassers lösten:

Glycerin	8 ccm
Chlornatrium	1,2 g
Chlorcalcium	0,02 g
Magnesiumsulfat	0,08 g
Dikaliumphosphat	0,5 g
Ammoniumlactat	1,2 g
Asparaginsaures Natron . .	0,8 g.

Die gut durchgemischte Lösung wurde in Portionen von je 8 ccm in Reagensgläser abgefüllt und die Gläser 2 mal sterilisiert.

Der Eisennährboden unterscheidet sich von dem Uschinski-Nährboden lediglich dadurch, daß zu 200 ccm Uschinski-Nährboden noch 8 ccm einer 1 %igen Lösung von Ferrosulfat hinzugefügt wurden.

Auch mit dem von Maaßen angegebenen Nährboden haben wir gearbeitet. Hier beschränkten wir uns aber auf einige Versuche, weil der Nährboden keine Vorteile gegenüber dem Uschinskischen für unsere Zwecke zeigte. Hergestellt wurde der Nährboden, indem wir 1,4 g Äpfelsäure in destilliertes Wasser brachten, mit Kalilauge neutralisierten, dann zufügten:

Asparagin	2 g
Magnesiumsulfat	0,08 g
Dikaliumphosphat	0,04 g
Kryst. Natriumcarbonat . .	0,5 g
Chlorcalcium	0,002 g
Glycerin	8 ccm.

Die Lösung wurde auf 208 ccm aufgefüllt und im übrigen wie bei dem Uschinski-Nährboden verfahren.

Impfte man auf den Uschinski-Nährboden oder den Eisennährboden von der Bouillonkultur einige Ösen ab, so kam es zu deutlichem und ziemlich kräftigem Wachstum. Wenn man aber die Impfung in derselben Weise fortsetzen wollte, indem man von einem Uschinski- oder Eisenröhrchen die Bakterien

[1]) J. König, Chem. d. menschl. Nahrungs- u. Genußm. 3, 646.

auf ein zweites übertragen wollte, so entwickelten sich die Bakterien gar nicht oder nur ganz kümmerlich. Es genügte aber, einige Ösen steriler Bouillon dem Nährboden zuzusetzen, um auch in diesem Falle ein kräftigeres Wachstum zu erreichen. Wie geringe Bouillonmengen bereits genügen, um das Wachstum auf dem Uschinski-Nährboden deutlich zu verstärken, geht auch aus folgender Beobachtung hervor. Wenn man von einer eben beschriebenen, kaum gewachsenen Uschinski-Kultur oder Eisenkultur zweiter Generation einige Ösen auf Bouillon überträgt, so beobachtet man, daß nach der Abimpfung sich die Kultur kräftiger entwickelt als vorher. Man bringt ja bei dem Abimpfen in der üblichen Weise auch Spuren der Bouillon in den Ausgangsnährboden, und diese Spuren genügen schon, um das Wachstum zu vermehren.

In der Bouillon tritt aber regelmäßig, wenn man auch noch so wenig Bakterien aus einem Uschinski-Nährboden erster oder zweiter Generation auf Bouillon übertragen hat, ein sehr starkes Wachstum ein, das durchaus dem entspricht, wie wir es sehen, wenn wir direkt von Bouillon auf Bouillon die Bakterien übertragen.

Zusammenfassend kann man die bisherigen Beobachtungen dahin deuten, daß nur so lange eine Vermehrung der Bakterien auf dem Uschinski-Nährboden stattfindet, wie noch ganz geringe Bouillonspuren in ihm anzunehmen sind. Daher leidliches Wachstum nach der ersten Überimpfung, höchstens spurenweise nach der zweiten Überimpfung, deutliche Verstärkung bei Zusatz von Bouillonspuren bei der zweiten Überimpfung, endlich sofort ganz kräftiges Wachstum bei der direkt oder indirekt erfolgenden Rückübertragung auf Bouillon.

Wie ist es nun mit der Fermentbildung? Nach den Resultaten unserer früheren Versuche waren wir auf Grund von Vergiftungsstudien zu der Anschauung gelangt, daß die Entwicklungshemmung der Bakterien mit der Hemmung der Fermentbildung zusammenhängt und wohl die Entwicklungshemmung auf die Hemmung der Fermentbildung zurückzuführen ist.

Wie steht es nun mit der Fermentbildung bei den verschiedenen Kulturen.

1. Abimpfung von Bouillon auf Uschinski-Nährboden. — Geprüft wurde immer je 1 ccm.

		Überimpft unter Zusatz von 4 Ösen Bouillon
Kultur, 2tägig	1,5	
	2,7	
„ „	2,2	
	3,8	
„ 3tägig	2,0	6,0
	2,7	6,3
„ „	4,2	
	4,6	
„ 4tägig	1,3	
	2,4	
„ 5tägig	2,85	6,0
		6,3

2. Abimpfung von Uschinski-Nährboden auf Uschinski-Nährboden. — Geprüft wurde immer je 1 ccm.

Kultur, 1tägig	1,5
	1,8
„ 3tägig	4,6
	4,7

3. Reichliche Abimpfung (4 Ösen) von Bouillon, die von Uschinski-Nährboden abgeimpft war, auf Uschinski-Nährboden.

Nach 1tägiger Bouillonzüchtung:

Uschinski-Kultur, 2tägig	8,5
	9,5
„ „ 5tägig	1,6
	1,8

Nach 4tägiger Bouillonzüchtung:

Uschinski-Kultur, 1tägig	17,2
	17,3
„ „ 6tägig	2,9
	3,3

4. Abimpfung von Uschinski-Nährboden auf Bouillon.

Kultur, 1tägig, 0,5 ccm	29,8
	32,0
„ „ 1 ccm	53,2
	53,3
„ „ „	56,0
	56,6
„ „ „	59,9
	64,4

5. Abimpfung von Bouillon auf Maaßen-Nährboden. — Wachstum erst ganz allmählich sichtbar.

Kultur, 10tägig, 1 ccm . . . . . { 2,3 / 3,2

6. Abimpfung von Bouillon auf Eisennährboden.

Kultur, 2tägig . . . . . { 4,0 / 4,5

" " . . . . . { 11,1 / 11,9

" 3tägig . . . . . { 3,5 / 4,2

" " . . . . . { 6,7 / 9,8

" " 23,1

" " . . . . . { 22,9 / 25,9

" 4tägig 16,1

" 5tägig . . . . . { 2,6 / 3,8

7. Abimpfung von Eisennährboden auf Eisennährboden.

Kultur, 6tägig . . . . . { 5,5 / 7,8

" 7tägig 16,1

" " . . . . . { 5,0 / 6,5

" " . . . . . { 1,1 / 2,4

" 8tägig . . . . . { 1,2 / 1,3

8. Abimpfung von Eisenkultur auf Bouillon.

Kultur (von einer 4tägigen Eisenkultur), 1tägig . { 71,4 / 71,5

Kultur (von einer 1tägigen Eisenkultur, die ihrerseits von einer Eisenkultur stammte. In der 2. Eisenkultur kaum eine Trübung wahrnehmbar).

Bouillon gut gewachsen, 1tägig . . . . . { 60,0 / 61,5

Kultur (von einer 2tägigen Eisenkultur, die ihrerseits von einer Eisenkultur stammte. In der 2. Eisenkultur keine Trübung wahrnehmbar).

Bouillon gut gewachsen, 1tägig . . . . . { 62,9 / 63,0

Kultur (von einer 3tägigen Eisenkultur, die ihrerseits von einer Eisenkultur stammt. In der 2. Eisenkultur keine Trübung wahrnehmbar).
Bouillon gut gewachsen, 1tägig . . . . . { 64,3 / 65,1

9. Zusatz von Bouillon während der Harnstoffspaltung zu Uschinski- und Eisennährboden.

In diesen Versuchen wurde die Bouillon erst während der Spaltung zugefügt, während die Bakterien auf den anderen Nährböden gezüchtet waren.

1 ccm 3tägige Uschinski-Kultur:

a) mit 1 ccm Wasser . . . . . { 4,2 / 4,6
b) „ „ Bouillon . . . . . { 82,6 / 84,75

1 ccm 2tägige Eisenkultur:

a) mit 1 ccm Wasser . . . . . { 11,1 / 11,9
b) „ „ Bouillon . . . . . { 81,1 / 84,5

1 ccm 3tägige Eisenkultur:

a) mit 0,5 ccm Wasser . . . . . { 3,5 / 4,2
b) „ 0,4 „ „ . . . . . { 53,0
„ 0,1 „ Bouillon . . . .
c) „ 0,5 „ „ . . . . { 66,7 / 66,8

Das bisherige Resultat läßt sich also dahin zusammenfassen, daß bei vollkommener Abwesenheit von Bouillon die Bakterienkulturen am Leben und entwickelungsfähig bleiben, ihre Entwickelung und Fermentbildung aber gehemmt ist. Schon der Zusatz von Bouillonspuren genügt, um beide Prozesse lebhaft in Gang zu bringen.

Nach dieser grundsätzlichen Orientierung war es möglich, an die Stelle der Bouillon Stoffe von bekannter, chemischer Konstitution zu setzen. Untersuchungen nach dieser Richtung sind bereits in Angriff genommen und scheinen zu klaren Resultaten zu führen. Darüber wird in der nächsten Mitteilung berichtet werden.

Über physikalisch-chemische Eigenschaften des isolierten Froschrückenmarks und seiner Gefäßhaut.

Von

Rudolf Unger.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 16. Januar 1917.)

Mit 1 Figur im Text.

I. Einleitung und Literatur.

In einer vorangehenden Arbeit[1]) waren wir bei Untersuchungen über Oxydationsprozesse im isolierten Froschrückenmark in anisotonischen NaCl-Lösungen aufmerksam geworden auf den Einfluß der Pia mater. Nur wenige orientierende Versuche hatten uns damals dazu geführt, die Pia mater als eine für Wasser durchlässige, für NaCl nicht oder schwer durchgängige, also im Sinne der Osmosetheorie semipermeable Membran aufzufassen. Die Beobachtung, daß anscheinend diese dünne, das Rückenmark umhüllende, gefäßführende Haut für die von der Lipoidtheorie geforderte Impermeabilität des Rückenmarks gegen Kochsalz verantwortlich zu machen war, während das von der Pia mater entblößte Rückenmark selbst — das lipoidreichste Organ des Körpers — für Kochsalz sich als durchgängig erwies, erschien für die Kenntnis der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Nervensubstanz so bedeutungsvoll, daß wir weitere Versuche in dieser Richtung anstellten.

Wir untersuchten zu diesem Zwecke die Gewichtsänderungen des isolierten Froschrückenmarks in neutralen wäßrigen Lösungen der Chloride von Alkali-, Erdalkali- und Schwer-

[1]) R. Unger, Untersuchungen über den Einfluß von anorganischen Lösungen auf die Oxydationsprozesse und die Reflexerregbarkeit des isolierten Froschrückenmarks. Diese Zeitschr. **61**, 103, 1914.

metallen, ferner Na-Salzen verschiedener Säuren und in Lösungen organischer Substanzen von wechselnder Konzentration. Dabei beschäftigte uns die Beantwortung der Frage: Wodurch sind diese Gewichtsänderungen des Rückenmarks bedingt; sind sie capillärer, osmotischer oder kolloidaler Natur, und welche Rolle spielt dabei die Pia mater spinalis, oder richtiger die sogenannte pimäre Gefäßhaut? Denn nach Ecker-Wiedersheim-Gaupp[1]) ist eine Trennung dieser feinen Haut in zwei Lamellen (Pia und Arachnoidea) nur stellenweise angedeutet. Wir wollen im folgenden also unter Pia mater diese primäre Gefäßhaut im Gegensatz zur Dura mater des Froschrückenmarkes verstehen.

Zu der Frage der Gewichtsänderungen von Nervengewebe in wäßrigen Lösungen liegen vor allem Untersuchungen von Bauer[2]) vor, der zu dem Ergebnis gelangte, daß die Flüssigkeitsaufnahme durch das Nervengewebe in seinen Versuchen nicht nach den Gesetzen der Osmose, sondern offenbar nach den Gesetzen der molekularen Imbibition oder Quellung im engern Sinne erfolgte. Er experimentierte mit Stücken von Leichenhirnen und hebt selbst hervor, daß es nicht angeht, auf Grund der Tatsache, daß die Flüssigkeitsaufnahme des toten Gewebes, nach den Gesetzen der molekularen Imbibition erfolgt, Schlüsse zu ziehen auf Wasserverschiebungen im lebenden Gewebe, wie sie z. B. beim Ödem auftreten.

Tatsächlich hat bereits Cannon[3]) die Bedeutung der normalen Ernährungsverhältnisse des Gehirns für seine Imbibitionsverhältnisse festgestellt, da er bei Ersatz des Blutes durch physiologische Salzlösung ein rasches Ansteigen des Hirndruckes infolge von Wasseraufnahme beobachtete, die auch an isolierten, in Salzlösung eingelegten Hirnstücken nachweisbar war, und die er auf eine Erhöhung des osmotischen Druckes im Innern zurückzuführen suchte.

Renauld[4]) glaubte, durch Perfusionsversuche an Hunden direkt den Einfluß der Vitalität auf die Reaktionsweise dartun zu können. Er durchströmte den Kopf der Tiere sofort nach der Dekapitation mit isotonischer (0,9%) NaCl-Lösung und dann abwechselnd für bestimmte Zeiten mit hyper- bzw. hypotonischen Lösungen (1,5% bzw. 0,6%).

---

[1]) Anatomie des Frosches 1, 125.

[2]) Bauer, Studien über Quellung von Nervengewebe. Arbeit. a. d. Neurologisch. Instit. an d. Wiener Univ. 19, 87, 1912. (Daselbst auch Übersicht über die ältere Literatur.)

[3]) Cannon, Americ. Journ. of Physiol. 6, 1901.

[4]) H. Renauld, Recherches sur le pouvoir osmotique de la cellule nerveuse. Trav. de l'Instit. Solvay, Bruxelles 1908. Zitiert n. Hermann, Jahresber. üb. d. Physiol., Neue Folge 18, 1909.

Das Hirnvolumen wurde mit Hilfe eines Plethysmographen registriert und beobachtet, daß es bei Durchströmung mit hypertonischer Lösung um ebensoviel ab-, wie es bei solcher mit hypotonischer Lösung zunahm. 30—50 Min. nach dem Tode blieb die Semipermeabilität der Nervenzellen voll erhalten, dann aber wurden als Zeichen der Störung der Semipermeabilität die Ausschläge ungleich, nahmen ab, um schließlich aufzuhören. Renauld hat jedoch nicht berücksichtigt, daß bei dieser Art der Untersuchung die Permeabilität der Gefäße mit von ausschlaggebender Bedeutung sein muß und seine Versuche daher über das Verhalten des Nervengewebes selbst nichts Bestimmtes auszusagen gestatten.

Die Versuche von Flatau[1]), Reichardt[2]), der seine umfangreichen „Untersuchungen des gesunden und kranken Hirnes mittels der Wage" an Menschenhirnen anstellte, und Zanke[3]), der mit exstirpierten Kaninchengroßhirnen arbeitete und auf dessen Ergebnisse wir noch mehrfach später zurückkommen werden, sind zur Gänze an totem Material ausgeführt.

Über den Einfluß der Pia mater auf Gewichtsänderungen des Gehirns in wäßrigen Lösungen ist uns nur eine einzige Beobachtung von Donaldson[4]) bekannt, der fand, daß das Gehirn in einer 2%igen Kaliumbichromatlösung langsamer an Gewicht zunimmt, wenn die Pia daran gelassen wird. Auch er untersuchte Hirne von Schafen, Haifischen und Menschen post mortem.

II. Methodik.

Die Experimente wurden folgendermaßen ausgeführt: 2 nach bekannter[5]) Art isolierte Rückenmarke möglichst gleich großer grüner Wasserfrösche (Rana esculenta) wurden unter absolut gleichen Bedingungen (d. h. in denselben Lösungen, unter steter Durchleitung von O_2, unter Vornahme durchaus gleichartiger Wägungen usf.) untersucht; das eine Rückenmark war intakt mit Pia mater, vom andern war die Pia mater vor Beginn des Versuches abgezogen worden. Es mußten dann unter Berücksichtigung der individuellen Schwankungen Differenzen im Verhalten der beiden Rückenmarke eines Versuches auf die An- bzw. Abwesenheit der Pia mater zu beziehen sein.

Jedes Rückenmark wurde nach Freilegung des Wirbelka-

[1]) Flatau, Anatomisch. Anz. **13**, 323, 1897.
[2]) Arbeit. aus d. Psych. Klin. zu Würzburg, 1906.
[3]) Zanke, Neurolog. Zentralbl. 19 u. 881, 1897.
[4]) Donaldson, Journ. of morphology **9**, 123, 1894.
[5]) Vgl. H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Zeitschr. f. allgem. Physiol. **6**, 315, 1907.

nals am Kopfende mit einem kurzen Zwirnfaden umschlungen, an diesem während aller Manipulationen gefaßt und verweilte zunächst einige Minuten in der Lösung, in der sein weiteres Verhalten geprüft werden sollte, bevor sein Gewicht festgestellt wurde. In dieser Zeit lösten sich die noch vorhandenen Blut- und Kalkreste ab, und es wurde die gleiche Benetzung des Rückenmarkes mit Flüssigkeit wie bei den folgenden Wägungen erzielt. Das Gewicht eines so präparierten Rückenmarkes betrug mit Pia mater 40 bis 80 mg, je nach der Größe des Tieres. Obwohl wir in einzelnen Versuchen Gewichtszunahmen von 100 und mehr Prozent verzeichnen konnten, sind die im allgemeinen beobachteten Gewichtsdifferenzen so gering, daß es bei der Kleinheit und dem geringen Gewichte des Objektes darauf ankommt, möglichst jeden Fehler bei den Wägungen auszuschalten. Eine ungleiche Benetzung des Rückenmarkes mit Flüssigkeit bei den einzelnen Wägungen erwies sich als wichtigste Fehlerquelle, zu deren möglichster Ausschaltung sich bei vergleichenden Versuchen am besten die folgende Methode bewährt hat.

Das Rückenmark wird in ein Wägegläschen mit eingeschliffenem Deckel gebracht, auf dessen Boden sich eine Schicht der gleichen Lösung befindet, aus der das Rückenmark genommen wurde, so hoch, daß letzteres vollkommen davon bedeckt ist. Dieses Gefäß wird zuerst mit dem Rückenmark, sodann, nach sorgfältiger Herausnahme — die stets durchaus gleichartig zu erfolgen hat — und Wiedereinbringung des Rückenmarkes in seine erste Lösung, ohne dasselbe gewogen. Die Differenz beider Wägungen gibt das Gewicht des Rückenmarkes an. Es wurden ferner, da sich auch bei größter Sorgfalt Unterschiede von 1—2 mg bei zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden derartigen Wägungen nicht vermeiden lassen, stets das Mittel aus zwei solchen Wägungen genommen. Weder durch vorheriges, vorsichtiges Abtrocknen und nachfolgendes Wägen auf Fließpapier noch auch durch Wägen ohne solches auf Papier oder einem Objektträger ließen sich die Fehlerquellen so einengen, wie durch die eben geschilderte Methode.

Durch die Lösungen, in denen sich die Rückenmarke während der Dauer eines Versuches befanden, wurde ein ständiger Sauerstoffstrom geleitet. Wir wollten damit die Erstickung und Bildung von Säure möglichst hintanhalten; wie

wir überhaupt im Gegensatz zu den eingangs zitierten Autoren bestrebt waren, auch durch die Art und Dauer des Versuches uns dem Ideal einer anatomischen und funktionellen Intaktheit des isolierten Organs möglichst zu nähern. Wir sind uns wohl bewußt, daß wir in manchen Versuchen — so z. B. mit Lösungen von Substanzen, die intensive Gifte für das Nervengewebe darstellen — von diesem Ziele mehr oder minder weit entfernt waren. Dennoch halten wir uns berechtigt, diesen Faktor der annähernden physiologischen Norm des Untersuchungsmaterials mit in Rechnung zu stellen im Hinblick auf früher beschriebene Versuche an Reflexpräparaten[1]), die nach mehr als vierstündigem Verweilen sogar in hypertonischen NaCl-Lösungen sich doch so weit erholten, daß sie wieder deutliche Reflexe auf Kneifen der Zehen ergaben. Auch in Versuchen mit Lösungen von $NaCl + CaCl_2$, die den in vorliegender Arbeit angewandten gleich oder sehr ähnlich sind, wurden die Reflexpräparate erst nach 105 bis 110 Min. reaktionslos, erholten sich aber in 0,7% NaCl-Lösung wieder. Diese Versuche beweisen m. E., daß man bei einem großen Teil der verwendeten Lösungen nach einer Zeit von etwa 2—4 Stunden wohl noch von einer annähernden funktionellen Intaktheit des Organs sprechen kann. Wir beschränkten deswegen die Dauer der Versuche auf diese Zeit, nachdem uns Versuche von mehr als 20 Stunden Dauer davon überzeugt hatten, daß dann die infolge der Kleinheit und des geringen Gewichts des Objekts genau zu berücksichtigenden Fehlerquellen zu groß werden und die Versuche nicht mehr zu exakten, vergleichend verwertbaren Ergebnissen führten. Kommt es doch nach einer Zeit von 20 und mehr Stunden trotz Durchleitung von O_2 zur Bildung größerer Mengen von Säure, die die Wasseraufnahme des Gewebes in weitem Maße beeinflussen, zur teilweisen Auflösung von Gewebsbestandteilen in der betreffenden Lösung und wohl auch schon zu bakteriellen Zersetzungsprozessen.

Die Temperatur der Lösungen hatte in unseren Versuchen keinen deutlichen Einfluß auf die Ergebnisse. So zeigten z. B. Rückenmarke in 0,7% NaCl- und in 3,55% Dextroselösungen bei 2 bis 5°, prinzipiell und graduell analoge Gewichtsänderungen

[1]) R. Unger, l. c., S. 107, 117, 121.

wie bei Temperaturen von 17 bis 20°, bei denen die übrigen Versuche angestellt wurden. Auch Zanke (l. c.) findet bei seinen Versuchen an toten Kaninchengroßhirnen in Aqua destillata, daß „merkwürdigerweise" die Steigerung der Temperatur ohne Einfluß zu sein scheint. Er fand bei 36° nach vier Stunden eine Gewichtszunahme von 155% und 156%, bei Zimmertemperatur von 158%.

Die Lösungen, mit denen wir arbeiteten, waren für Gewebe des Frosches isotonische und hypertonische. Bei einigen Versuchen verwandten wir die zu untersuchenden Substanzen einfach in wäßriger Lösung, bei den meisten dagegen ersetzten wir einen bestimmten Teil, immer je 0,3% der 0,7%igen, bzw. 1,3% der 2%igen NaCl-Lösung durch die zu untersuchenden Substanzen. Um bei der verschiedenen Wertigkeit der Ionen die Isotonie der Lösungen annähernd zu wahren und eine etwaige Beeinflussung durch den abweichenden osmotischen Druck auszuschalten, verwandten wir Salzlösungen, die mit Hilfe der isotonischen Koeffizienten von de Vries nach Hamburger[1]) berechnet waren.

III. Versuchsergebnisse.

Die Versuchsergebnisse sind in den folgenden Tabellen zum Vergleich der Gewichtsdifferenzen (in % des Anfangsgewichtes) nach zwei und nach vier Stunden von Rückenmark mit und ohne Pia mater zusammengestellt.

Die Unterschiede der Gewichtsveränderungen des Rückenmarkes mit und ohne Pia mater in den einzelnen Lösungen lassen sich in dieser Zusammenstellung der Ergebnisse leicht überblicken und sollen im Folgenden näher erörtert werden.

IV. Erörterung der Versuchsergebnisse.

1. Natur der Gewichtsänderungen.

Gehen wir von den Versuchen aus, die sich von den natürlichen Verhältnissen am weitesten entfernen, uns daher das Extrem der Veränderung zeigen! Wir legen ein Rückenmark in destilliertes Wasser und beobachten nach kurzer Zeit eine ganz außerordentliche Gewichts-(und Volum-)vermehrung, die

[1]) Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre ... 1, 24, 1902.

Tabelle I. Kationen.

Nr.	Lösungen	Anfangsgewicht in mg +P.M.	Anfangsgewicht in mg −P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 2 St. +P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 2 St. −P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 4 St. +P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 4 St. −P.M.	Bemerkungen
1	Aqua destillata	79,4	84,6	+ 30,7	+144,0	+ 55,1	+231,0	
2	0,4% NaCl . . . . . **	47,7	54,9	+ 9,8	+ 19,5			
3	0,7% NaCl	45,6	48,7	+ 0,0	+ 17,9	± 0,0	+ 23,6	
4	„		72,2		+ 10,0		+ 18,0	
5	2,0% NaCl . . . . . *	76,8		− 5,7				
6	„	57,0	52,6	− 3,5	+ 8,7			
7	„	50,1	52,2	− 8,8	+ 7,5			
8	3,0% NaCl . . . . . **	72,1	55,2	± 0,0	+ 6,4	± 0,0	+ 9,6	
9	0,4% NaCl + 0,38% KCl	70,6	64,9	+ 10,6	+ 17,4	+ 8,9	+ 21,1	
10	„	58,7	31,5	+ 9,2	+ 19,0			
11	2,0% KCl . . . . . **	56,0	57,0	+ 13,6	+36,7[1]			[1]) Gewichtsdifferenz nach 3 Std.
12	0,7% NaCl + 1,66% KCl *	49,0		± 0,0				
13	„	48,6	48,3	± 0,0	+ 6,2			
14	0,4% NaCl + 0,27% NH_4Cl	76,4	58,7	± 0,0	+ 14,8	± 0,0	+ 24,7	
15	„	54,4	59,4	+ 4,8	+ 16,6		+ 24,0	
16	0,7% NaCl + 1,19% NH_4Cl *	60,6	59,5	± 0,0	+ 10,9			
17	0,4% NaCl + 0,43% $CaCl_2$	53,1	46,7	± 0,0	+ 9,0			
18	„	69,7	70,4			± 0,0	+ 9,1	
19	0,7% NaCl + 1,84% $CaCl_2$ *	78,1	52,9	− 6,4	+ 4,7			
20	0,4% NaCl + 0,78% $MgCl_2$	71,1	45,2	− 4,6	± 0,0			
21	„	61,5	65,2	− 2,6[1])	± 0,0[1])	− 2,6[2])	+ 4,8[2])	[1]) nach 3 u. [2]) „ 5 Std.
22	0,7% NaCl + 3,38% $MgCl_2$ *	55,9	38,8	− 8,8	+ 0,0			
23	0,4% NaCl + 0,61% $SrCl_2$.	60,2	70,6	+ 4,3	+ 4,0	+ 3,3	+ 9,8	
24	0,4% NaCl + 0,94% $BaCl_2$.	67,3	67,8	± 0,0	+ 8,3	± 0,0	+ 13,6	
25	0,4% NaCl + 0,65% $CuCl_2$	63,2	56,2	+ 6,6	+ 4,4	+ 7,3	+ 8,1	
26	„	54,1	48,6	+ 7,8	+ 4,9	+ 10,0	+ 4,7	
					(+ 2,2)		(+ 2,2)	Lösungn.
27	0,4% NaCl + 0,49% $FeCl_3$.	58,9	69,7	+ 3,6	± 0,0	+ 4,8	± 0,0	reagieren
28	0,4% NaCl + 0,42% Fe_2Cl_6 .	63,3	39,1	+ 7,9	+ 12,0			sauer.
29	0,4% NaCl + 0,49% $FeCl_3$.	65,1	63,6	+ 7,4	+ 6,8			
30	3% NaCl **	78,3	74,8	− 4,1	+ 5,3			
31	5% NaCl **	77,0	62,5	− 2,9	+ 8,8			

Tabelle II. Anionen.

Nr.	Lösungen	Anfangsgewicht in mg +P.M.	Anfangsgewicht in mg −P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 2 St. +P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 2 St. −P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 4 St. +P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 4 St. −P.M.	Bemerkungen
1	0,4% NaCl + 0,95% NaJ .	59,7	64,0	± 0,0	+ 11,6	± 0,0	+ 13,1	
2	0,7% NaCl + 4,13% NaJ *	58,3	74,9	± 0,0	+ 10,2			
3	0,4% NaCl + 0,55% Na_2SO_4	53,2	51,7	± 0,0	+ 10,6	± 0,0	+ 16,0	
4	0,7% NaCl + 2,37% Na_2SO_4 *	69,1	56,9	− 9,8	+ 0,0			
5	0,4% NaCl + 0,44% $NaNO_3$	69,3	61,8	± 0,0	+ 10,8	± 0,0	+ 14,4	
6	0,4% NaCl + 0,79% Na-Citrat	65,5	76,4	± 0,0	+ 8,6	± 0,0	+ 11,9	
7	0,4% NaCl + 0,70% Na-Acetat	67,4	53,0	± 0,0	+ 9,1	+ 3,4	+ 15,6	
8	0,4% NaCl + 0,58% Na-Lactat	71,3	62,5	+ 3,7	+ 14,8	+ 7,4	+ 21,1	

*) Die mit einem * versehenen Lösungen sind mit 2%, die übrigen, mit Ausnahme der Lösungen ** in Versuch 2, 8, 11, 30 u. 31 auf Tab. I mit 0,7% NaCl isotonisch.

Tabelle III. Organische Substanzen.

Nr.	Lösungen	Anfangsgewicht in mg +P.M.	Anfangsgewicht in mg −P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 2 St. +P.M.	Gewichtsdiffer. in % nach 2 St. −P.M.	Bemerkungen
1	0,4% NaCl + 0,5 % Gelatine . .	64,7	69,7	+ 8,4	+ 16,5	
2	0,4% NaCl + 0,71% Glycerin . .	64,8	58,0	+ 9,1	+ 17,6	
3	0,4% NaCl + 2,63% Rohrzucker .	58,5	61,6	± 0,0	+ 8,1	
4	0,4% NaCl + 1,52% Traubenzucker	68,9	54,9	± 0,0	+ 9,7	0,7% NaCl isosmot.
5	3,55% Traubenzucker	44,0	60,2	+ 18,6	+104,3	
6	0,7% NaCl + 6% Traubenzucker* .	52,3	43,5	− 5,7	± 0,0	
7	0,4% NaCl + 0,46% Harnstoff . .	70,1	74,6	+ 7,4	+ 18,8	
8	0,4% NaCl + 0,68% Urethan . . .	56,2	42,6	+ 7,8	+ 12,4	
9	0,4% NaCl + 1,27% Chloralhydrat .	60,8	77,4	+ 12,2	+ 20,4	
10	0,7% NaCl + 5,51% Chloralhydrat*	70,9	62,6	+ 18,2	+ 16,0	
11	0,4% NaCl + 0,36% Äthylalkohol	63,2	63,9	+ 7,3	+ 16,0	
12	"	58,4	65,6	+ 6,9	+ 15,4	

nur durch Aufnahme von Wasser durch das Organ bedingt sein kann, also einen Quellungs- oder Imbibitionsvorgang im weitesten Sinne des Wortes darstellt. Wir geben zu dem destillierten Wasser Elektrolyte, Elektrolytkombinationen, Nichtleiter und Kombinationen von Leitern und Nichtleitern und beobachten durchgehends eine Herabsetzung der maximalen Quellung in Aqua destillata. Diese kann so weit gehen, daß das Organ gewichtskonstant bleibt, die Quellung also durch die Wirkung der Zusätze total kompensiert wird, ja, unter gewissen Bedingungen kann es sogar zu einer Gewichtsabnahme, einer Entquellung des Rückenmarkes kommen.

Zur Analyse dieser Quellungserscheinungen halte ich es für angebracht, den Darlegungen Hofmeisters[1]) über den Begriff der Quellung zu folgen. Er unterscheidet:

1. Eine capilläre Imbibition, bei der eine poröse Masse in vorgebildete, nach außen offene Hohlräume Flüssigkeit aufnimmt.

2. Eine Imbibition durch Endosmose, bei der eine ebenfalls poröse Masse in vorgebildete, abgeschlossene, mit löslichen Stoffen oder Flüssigkeit gefüllte Hohlräume Flüssigkeit aufnimmt, und schließlich

3. Eine molekuläre Imbibition, bei der eine homogene, porenfreie Masse unter Volumvergrößerung Flüssigkeit aufnimmt.

[1]) Hofmeister, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. f. experim. Path. und Pharm. 27, 396, 1890.

In tierischen Geweben werden wahrscheinlich stets bei gegebenen Verhältnissen diese 3 Arten der Quellung nebeneinander vorkommen, nur werden sie unter verschiedenen Bedingungen am Zustandekommen der Quellung in ganz verschiedenem Maße beteiligt sein. Oft wird die eine oder andere Form so in den Hintergrund treten, daß man zur Erklärung einer beobachteten Gewichtsvermehrung nur die eine Art heranzuziehen braucht.

Untersuchen wir zuerst, welche Rolle bei unseren Versuchen die capilläre Imbibition spielt! Gegen eine solche, d. h. eine Flüssigkeitsaufnahme zwischen den einzelnen Gewebselementen, auch zwischen Pia mater und Nervensubstanz im subpialen Raume, also eine Ansammlung freier Gewebsflüssigkeit, wie sie bei den in vivo auftretenden Ödemen stattfindet, spricht schon das makroskopische Verhalten gequollenen Rückenmarks. Es ist nicht mehr möglich, es nach Art eines Zupfpräparats in einzelne Nervenfasern und Faserbündel aufzulösen, sondern stellt im Endstadium der Quellung eine makroskopisch mehr oder minder homogene, emulsoide Masse dar. Beweisend ist diese Beobachtung dafür, daß eine rein capilläre Imbibition nicht ausschließlich vorliegen kann. Wenn nämlich letzteres der Fall wäre, müßte man noch leichter, als dies beim frischen Marke möglich ist, es in seine einzelnen Bestandteile auffasern können. Weder beim imbibierten größeren Kaninchen-, noch beim imbibierten Froschrückenmark gelang das jemals. Gänzlich ausschließen läßt sich allerdings durch diese Beobachtung die Möglichkeit nicht, daß in geringem Maße auch capillär gebundene freie Flüssigkeit im gewicht- und volumvermehrten Rückenmarke sich findet. Wenn aber, wie wir tatsächlich sehen werden, eine andere Art der Imbibition der Hauptfaktor bei diesen Vorgängen ist, so werden ja die capillären Räume, die das die Gewichtszunahme bedingende Wasser aufnehmen müßten, um so kleiner, je ausgesprochener der eben angedeutete Quellungsprozeß in Aktion tritt.

Gegen eine capilläre Imbibition spricht auch eine Beobachtung von Zanke (l. c.), der das Verhalten von Kaninchenhirnen in Leitungswasser untersuchte. Bei Versuchen, über das Wesen der Wasserbindung Aufschluß zu erlangen, kam er zu folgendem Ergebnis: „Auch beim stärksten Drucke gelingt es weder beim

imbibierten noch beim frischen Hirne, Wasser herauszupressen, ein Beweis, daß dasselbe chemisch im Gehirn gebunden ist. Es unterscheidet sich die Wasseraufnahme beim Hirn von der eines Schwammes ganz bedeutend." Wir versuchten, dieser Frage näherzutreten dadurch, daß wir Gefrierschnitte durch normale und gequollene Rückenmarke anlegten und uns im mikroskopischem Bilde zu vergewissern suchten, daß die Volumvermehrung nicht einfach durch Auseinanderdrängen der Nervenelemente durch capillär zwischengelagerte Flüssigkeit verursacht sei. Die technischen Schwierigkeiten waren zu groß, als daß wir zu eindeutigen Ergebnissen auf diesem Wege gelangen konnten. — Beim Vergleich von Zupf- und Quetschpräparaten frischen und gequollenen Rückenmarksgewebes (leicht mit Methylenblau angefärbt) fanden wir im gequollenen Gewebe den Hauptteil der weißen Substanz, die Markscheiden der Nervenfasern in weitestgehendem Maße verändert, ja aufgelöst. Wir gelangen also zu dem Schlusse, daß im Verhältnis zu den anderen Arten der Imbibition die capillär bedingte nur eine ganz untergeordnete Rolle spielen kann.

Inwieweit kommt dann eine endosmotisch bedingte Imbibition für die beobachteten Gewichtsänderungen in Frage? In nahezu allen Versuchen sehen wir, daß das Rückenmark mit und ohne Pia mater in isosmotischen Lösungen ganz verschiedene Gewichtsänderungen zeigt. Doch kann man, wie schon Winterstein[1]) betont hat, aus dieser Beobachtung nicht einfach den Schluß ziehen, daß dann osmotisch bedingte Gleichgewichtsverschiebungen für den Prozeß gar nicht in Frage kommen, vielmehr „kann die Ursache dieses Verhaltens ganz unklar bleiben, da sowohl Änderungen des osmotischen Drucks im Zellinnern, wie solche der Permeabilität, wie schließlich solche des Quellungsvermögens die gleichen Effekte herbeizuführen vermögen". Da das von Winterstein[2]) angegebene, für Untersuchungen von Muskelgewebe bewährte Verfahren, die durch Änderungen des Quellungsvermögens, des osmotischen Druckes und der Permeabilität bedingten Wasserverschiebungen voneinander zu sondern

[1]) H. Winterstein, Über osmotische und kolloidale Eigenschaften des Muskels, diese Zeitschr. 75, 49, 1916.

[2]) H. Winterstein, Die Untersuch. der osmot. u. kolloid. Eigenschaften d. Gewebe. Wien. med. Wochenschr. 1916, 551.

für Rückenmarksgewebe sich nicht durchführbar erwies, so müssen wir zwar den Versuch einer experimentellen Sonderung etwa osmotisch bedingter Gleichgewichtsverschiebungen schuldig bleiben. Daß diese aber im allgemeinen keine bedeutende Rolle spielen können, folgt ohne weiteres aus der großen Zahl von Versuchen, in denen das Rückenmark sowohl mit wie ohne Pia mater in isosmotischen, das Rückenmark ohne Pia mater auch in hypertonischen Lösungen Gewichtszunahmen zeigt. Diese können ebensowenig osmotischer Natur sein wie die außerordentlichen Unterschiede in der Wirkung isotonischer Lösungen, so z. B. von NaCl und Traubenzucker in den Versuchen 4 u. 5, Tab. III, in denen die mit 3,55% Traubenzucker isosmotische 0,4% NaCl- + 1,52% Traubenzuckerlösung nur etwa den zehnten Teil der Gewichtszunahme herbeiführt wie die reine Traubenzuckerlösung. Auch die Intensität der Gewebsveränderung, die nach längerem Verweilen in manchen mit dem Gewebe isotonischen (!) Lösungen bis zur Umwandlung des piafreien Rückenmarkes in eine emulsoide Masse fortschreiten kann, schließt wohl jede Möglichkeit osmotischer Ursachen aus. Jedoch kommen osmotisch bedingte Wasserverschiebungen wahrscheinlich beim piabekleideten Rückenmarke in gewissen hypertonischen Lösungen mit in Betracht. Wir werden darauf bei Erörterung des Einflusses der Pia mater noch zurückkommen.

Da wir so zu einer Ablehnung der durch capilläre und endosmotische Imbibition verursachten Wasserverschiebung im Rückenmarke gelangt sind, kommen wir per exclusionem zu dem Schlusse, daß die überwiegende Mehrzahl aller beobachteten Gewichtsänderungen als vorwiegend durch eine molekuläre Imbibition, einen Quellungsvorgang im engeren Sinne bedingt aufzufassen sind. Es bestätigen also die Versuche am überlebenden isolierten Froschrückenmarke die von Bauer (l. c.) an Menschenhirnen post mortem festgestellte Art der Flüssigkeitsaufnahme des Nervengewebes.

2. Abhängigkeit der Quellung von verschiedenen Faktoren.

Wir beobachteten, daß alle Lösungen von Elektrolyten und Nonelektrolyten in den untersuchten Gemischen und Konzentrationen das in reinem Wasser erreichte Quellungsmaximum

verringerten. Da Elektrolyte im Verhältnis zu Aqua destillata das Quellungsvermögen organischer Stoffe sowohl steigern als auch herabsetzen können[1]), verdient dieses Verhalten des Rückenmarkgewebes hervorgehoben zu werden. Daß die Quellung von Hirnsubstanz in Wasser durch Zusatz von Salzen oder organischen Verbindungen vermindert wird, haben u. a. auch Zanke (l. c.) und Flatau (l. c.) schon früher beobachtet. Auch Bauer (l. c.) findet, daß Salze konstant die Quellung von Nervensubstanz in Wasser hemmen. Ausführlich ist für andere Gewebe diese Tatsache bei Fischer[2]) behandelt, der allerdings nur den Einfluß von Salzen usw. in schwach sauren oder alkalischen Lösungen und ohne jede Berücksichtigung osmotischer Faktoren untersucht hat. Dabei fand er ganz allgemein für Quellung von Gelatine, Fibrin und tierischen Geweben, daß die Zugabe irgendeines Salzes zu einer Säure- oder Laugenlösung den Quellungsgrad vermindert, während den Nichtelektrolyten diese ausgeprägte Wirkung der Elektrolyte nicht oder nicht in dem Maße zukommt.

Über den Einfluß der Konzentration der Salzlösungen läßt sich ferner folgendes feststellen:

1. Zusätze von Salzen und organischen Substanzen zu 0,4% NaCl-Lösung, derart, daß stets mit 0,7% NaCl-Lösung isotonische Lösungen entstehen, wirken trotz der Isotonie, wie schon vielfach beobachtet, auch hier in durchaus verschiedener Weise quellungshemmend.

2. Je stärker die Elektrolytkonzentration, um so ausgesprochener kommen die quellungshemmenden Eigenschaften der Ionen zur Wirkung. Das zeigt sich deutlich beim Vergleich der isotonischen mit den entsprechenden hypertonischen Lösungen.

3. Schon ganz geringe Zusätze von NaCl z. B. zu Aqua destillata verringern die Quellung ganz bedeutend, während sehr viel stärkere Konzentrationen eine relativ viel schwächere Erniedrigung bewirken. So betrug, wie Versuch 1 bis 4 und 6 bis 8 in Tab. I zeigen, die Gewichtszunahme des Rückenmarks ohne Pia mater nach 2 Std. in:

Aqua destillata	144,0%
0,4% NaCl-Lösung	19,5%
0,7% „ „	17,9 und 10,0%

[1]) s. Ostwald in Oppenheimer, Hdb. d. Biochemie I, 896.
[2]) Fischer, Das Ödem, Dresden 1910.

2,0% NaCl-Lösung . . . . . 8,7 und 7,5%
3,0% „ „ . . . . . 6,4 „ 5,3%.

Ganz analog verhielten sich Stücke weißer Substanz von Menschenhirnen bei Versuchen von Bauer (l. c.).

Die Geschwindigkeit des Quellungsvorgangs nimmt mit steigendem Quellungsgrade ab. Es entsprechen auch durchweg in unsern Versuchen gleichen Zeiteinheiten nicht die gleichen Gewichtszunahmen, sondern letztere werden in aufeinander folgenden Zeiteinheiten kleiner. Dieses Verhalten ist leicht ersichtlich beim Vergleich der Gewichtszunahmen nach 2 und 4 Std. in derselben Lösung.

Reversibilität der Quellungserscheinungen besteht für das Rückenmarkgewebe in ausgedehntem Maße; sie ist beim piabekleideten Rückenmarke noch weitgehender als beim piafreien. Die beiden folgenden Protokolle geben Beispiele für eine im ersten Falle weitgehende, im zweiten vollkommene Rückgängigmachung der Quellung durch Ca-haltige hypertonische Salzlösung,

1. Rückenmark ohne Pia mater, O_2-Durchleitung. $t = 20{,}0°$.

11^{35} in Aqua destillata
11^{39}, 11^{45} Gewicht . . . . . 84,6 mg
. . . . . 92,4 „
1^{34}, 1^{47} „ . . . . . 206,4 „
. . . . . 214,3 „
3^{39} „ . . . . . 280,0 „
3^{43} in 0,7% NaCl + 1,84% $CaCl_2$-Lösung
3^{47} schon ist makroskopisch eine deutliche Entquellung zu sehen, das Mark wird kleiner u. dichter
3^{53} Gewicht . . . . . 172,6 mg
4^{43} „ . . . . . 132,5 „
6^{43} Wägung unmöglich, da das Rückenmark infolge seiner Zerfließlichkeit zerreißt.

Das in 4 Std. von 84,6 mg auf 280,0 mg, d. h. um 195,5 mg, bzw. 231% gequollene Rückenmark verliert bei der Entquellung in den ersten 10 Min. bereits 107,4 mg oder 38,2%, in 1 Std. 147,5 mg, bzw. 52,7% an Gewicht. Es nimmt also bei diesen Versuchen auch die Geschwindigkeit der Entquellung mit steigendem Entquellungsgrade ab.

2. Rückenmark mit Pia mater, O_2-Durchleitung. $t = 20{,}0°$.

11^{02} in Aqua destillata
11^{05} Gewicht . . . . . 79,4 mg
1^{05} „ . . . . . 103,8 „
3^{05} „ . . . . . 123,2 „
3^{22} in 0,7% NaCl + 1,84% $CaCl_2$-Lösung

3^{25}	ist die Entquellung makroskopisch ausgesprochen	
3^{33}	Gewicht	105,2 mg
4^{22}	„	85,2 „
6^{22}	„	74,0 „

Das in 4 Std. von 79,4 mg auf 123,2 mg, d. h. um 43,8 mg, bzw. 45% gequollene Rückenmark verliert bei der Entquellung in den ersten 10 Min. ca. 23 mg bzw. 18%, in 1 Std. ca. 43 mg bzw. 33,5% an Gewicht; nach 3 Std. ist die Reversion so weit fortgeschritten, daß das Gewicht unter das Anfangsgewicht des frisch exstirpierten Organes um 5,4 mg, d. i. 6,8% gesunken ist.

In analoger Weise war auch Bauer (l. c.) bei seinen Versuchen zu dem Ergebnis gelangt: „Die Quellung von Nervengewebe ist ein zum großen Teil reversibler Vorgang."

Nichtelektrolyte haben nach den Versuchen M. H. Fischers (l. c.) auf die Quellung von Gelatine und Fibrin nur einen geringen Einfluß. Die in Versuch 5, Tab. III untersuchte Dextroselösung wirkt gegen Aqua destillata deutlich quellungshemmend. Die übrigen organischen Nonelektrolyte sind bei Anwesenheit von Kochsalz untersucht, stellen also nicht reine Nichtleiterwirkungen auf den Quellungsvorgang dar. Alle wirken in diesen Gemischen quellungshemmend, am stärksten die Zucker, Dextrose und Rohrzucker, am schwächsten Chloralhydrat; doch sind die Differenzen in der quellungshemmenden Wirkung im allgemeinen gering.

Die Ionenwirkung der Elektrolyte gestaltet sich folgendermaßen:

Während bei der Fibrinquellung in Neutralsalzlösungen vor allem die Anionen wirksam sind[1]), den Kationen jedoch geringere Bedeutung zukommt[2]), haben in unseren Versuchen die Kationen einen größeren Einfluß auf die Quellungsvorgänge als die Anionen. So wirken beim Rückenmark ohne Pia mater die zweiwertigen Kationen deutlich stärker quellungshemmend als die Anionen. (Durchschnittsverhältnis der Gewichtszunahmen nach 2 Stunden: 4,4%: 10,9%.)

In Übereinstimmung mit Versuchen von M. H. Fischer[3]) an Fibrin und von W. Ostwald[4]) an Gelatine bestätigen unsere Versuche das gegensätzliche Verhalten mehrwertiger Kationen gegenüber einwertigen. Nach diesen Autoren wird die

[1]) cf. Bechhold, Die Kolloide in Biolog. u. Medizin. 1912, S. 62.
[2]) cf. auch Ostwald in Oppenheimer, Hdb. d. Biochemie 1, 897.
[3]) und [4]) Zit. nach Bechhold (l. c.) S. 62.

Quellung durch die mehrwertigen Kationen in der Reihenfolge:

$$Mg > Ca > Ba > Sr > Cu > Fe$$

weit stärker herabgesetzt als durch einwertige. Wenn auch die Reihenfolge der Kationen sich für unsere Versuche ändert, so ist doch der gegensätzliche Einfluß von Mg und Ca z. B. zu Na, K, NH_4 unverkennbar.

Wollen wir, wie üblich, die Anionen, Kationen und Nichtleiter nach dem Grade ihrer Wirkung in Reihen ordnen, so treffen wir bei unseren Versuchsergebnissen auf besondere Schwierigkeiten. Die folgenden Erwägungen, die zugleich einen Beitrag zur Kritik ähnlicher Reihen liefern, sollen deshalb dartun, warum wir von einer Aufstellung solcher Reihen in dieser Arbeit gänzlich Abstand nehmen.

In unserem speziellen Falle wird die Ordnung, d. h. die Aufeinanderfolge der einzelnen Glieder der Reihe problematisch wegen der hauptsächlich durch Größen- und Gewichtsunterschiede bedingten Schwankungen, die die einzelnen Rückenmarke hinsichtlich ihres Quellungsvermögens zeigen. Auch sind die Gewichtsdifferenzen aufeinanderfolgender Glieder z. T. so gering, daß sie noch in den Bereich der durch individuelle Verschiedenheiten bedingten Schwankungen der Wasserverschiebung fallen, die Glieder also bei einer zweiten und dritten Versuchsreihe ihre Stellung zueinander zwanglos wechseln könnten.

Vor allem aber — und das ist ein Moment, das vielleicht auch bei anderen Untersuchungen größere Berücksichtigung verdiente — ist die Zeit, nach deren Ablauf die Gewichtsdifferenzen gemessen werden, von allergrößtem Einfluß auf die Ordnung der Reihe, insbesondere beim Experimentieren mit überlebenden Organen.

Daß man bei Aufstellung solcher Quellungsreihen, wenn die Zeit vernachlässigt wird, die verschiedensten Stellungen der einzelnen Glieder zueinander konstruieren kann, wird am deutlichsten ersichtlich aus folgender Zusammenstellung von drei hypothetischen Quellungskurven, deren Verlauf den experimentell gefundenen prinzipiell entspricht:

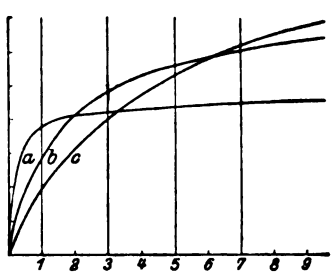


Fig. 1.

Auf der Abszisse des Systems sind die Zeiten, auf der Ordinate die Gewichte aufgetragen. Je nachdem, ob

man bei Zeiteinheit 1, 3, 5 oder 7 eine „Reihe" aufstellt, wird man zu folgenden absteigenden Reihen gelangen:

Zeiteinheit 1: a, b, c
„ 3: b, a, c
„ 5: b, c, a
„ 7: c, b, a

In diesem Falle wären nicht einmal die Endglieder auch nur einigermaßen konstant.

So würde nach Tab. II z. B. die Anionenreihe der Quellungshemmung für unsere Versuche lauten:
nach 2 Stunden:

Citrat > Acetat > Sulfat > Nitrat > Jodid > Lactat,

nach 4 Stunden dagegen:

Citrat > Jodid > Nitrat > Acetat > Sulfat > Lactat.

In ähnlicher Weise würden sich die anderen Reihen nach der Dauer der Versuche ändern.

Vielleicht hängt die in so auffälliger Weise nur innerhalb der ersten Stunden der Versuche eintretende Umstellung der Reihen, d. h. mit anderen Worten die Tatsache, daß sich die Quellungskurven oft innerhalb dieser Zeit schneiden, zusammen mit dem Absterben des Rückenmarkes, bzw. der Pia mater, das sich in Zustandsänderungen der Gewebe äußert, die bestimmte, bisher noch nicht näher erforschte Beziehungen zwischen quellbarem Körper und Quellungsmittel in dem eben dargelegten Sinne beeinflussen. Auch der im Tode auftretenden Säurebildung ist zu gedenken. Je nach der Schnelligkeit, mit der in den einzelnen Lösungen der Gewebstod eintritt, wird der Grad der Säurebildung steigen. Die Quellung aber wird nach Lillie durch winzige Säuremengen schon in starkem Maße beeinflußt.

Wie schon in der früheren Arbeit gezeigt wurde, sinkt in hypertonischen Lösungen bis herab zu Aqua destillata der O_2-Verbrauch des piafreien Rückenmarkes außerordentlich stark ab, während das Rückenmark immer stärker quillt. Um nun zu untersuchen, ob der Verminderung der Oxydationsprozesse eine vermehrte Säurebildung entspricht, die wiederum die Ursache des erhöhten Quellungsgrades der Gewebe sein könnte, untersuchten wir Rückenmarke mit und ohne Pia mater nach verschieden langem Verweilen in neutralen Salzlösungen auf ihre Reaktion mit Lackmuspapier. Letzteres wurde, um gewisse quantitative Ergebnisse zu erhalten, in $^n/_{100}$-, $^n/_{50}$-, $^n/_{10}$-Essig-

säure bzw. $^n/_{100}$-, $^n/_{50}$-, $^n/_{10}$-NaOH getaucht, entsprechend dem Verfahren von Winterstein[1]). Wir konnten jedoch auf diesem Wege zu eindeutigen Ergebnissen in dem Sinne, daß einer stärkeren Quellung eine erhöhte Wasserstoffionenkonzentration entsprechen würde, nicht gelangen.

3. Der Einfluß der Pia mater.

Vergleicht man alle entsprechenden Versuche mit und ohne Pia mater, so ergibt sich von dem Einflusse der letzteren auf die Quellungserscheinungen etwa folgendes Bild:

Von wenigen Ausnahmen abgesehen, zeigt das Rückenmark mit Pia mater nach beendetem Versuche ein prozentual geringeres Gewicht als das Rückenmark ohne Pia mater in der gleichen Lösung. Man hat ganz allgemein den Eindruck, als steigere die Anwesenheit der Pia mater den spezifisch quellungshemmenden Einfluß der untersuchten Elektrolyte, Elektrolytkombinationen und Nichtleiter. Diese Steigerung der quellungshemmenden Wirkung kann bis zu einer Entquellung des Organs führen. Da das piafreie Rückenmark unter keinen Umständen eine solche zeigt, kann also nur bei Anwesenheit der Pia mater gewissermaßen die Nullgrenze zwischen Quellung und Entquellung überschritten werden.

Eine Erklärung für dieses Verhalten sehen wir sowohl in der rein mechanischen Eigenschaft der Pia mater, infolge ihrer verhältnismäßig geringen Ausdehnungsfähigkeit eine stärkere, durch Quellung bedingte Volumzunahme des Nervengewebes zu verhindern, als auch in ihrem besonderen Verhalten gegenüber dem Durchtritt von Salzen.

Was die rein mechanisch zusammenhaltende Wirkung der Pia mater betrifft, so möchte ich auf die frühere Arbeit verweisen (l. c.). Gerade die Beobachtung der schon makroskopisch wahrnehmbaren Zerstörung des Nervengewebes in hypotonischen NaCl-Lösungen bei Abwesenheit der Pia mater hatte uns ja aufmerksam werden lassen auf den struktur- und formwahrenden Einfluß der letzteren bei ausgedehnteren Quellungsvorgängen. Bei solchen quillt das Nervengewebe an den Schnittflächen hervor, während die Pia mater in der ganzen Länge des Organs

[1]) H. Winterstein, Beiträge zur Kenntnis der Narkose. III. Bioch. Zeitschr. **70**, 132, 1915.

die die Quellung begleitende Volumvermehrung rein mechanisch verhindert. Da nun die Rückenmarke mit Pia mater in allen untersuchten Salz- usw. -lösungen sich hinsichtlich ihres Quellungsgrades in der Gegend der Nullgrenze, der Gewichtskonstanz, bewegen, könnten geringere Quellungsdrucke von der eine Ausdehnung verhindernden Pia mater möglicherweise kompensiert werden. Schwerlich aber wird man geneigt sein, die Entquellungen als lediglich mechanisch bedingt aufzufassen. Überhaupt scheint mir der Schwerpunkt des Problems in dem Verhalten der Salzpermeabilität der Pia mater zu liegen.

Da das piafreie Rückenmark in allen isotonischen Lösungen eine Quellung aufweist, so liegt es nahe, diese zurückzuführen auf ein Herausdiffundieren irgendwelcher quellungshemmender Bestandteile. Die Pia mater könnte nun den Austritt solcher Bestandteile aus dem Nervengewebe in die Lösung verhindern oder vermindern. Da wir wissen, daß alle anorganischen Neutralsalze die Quellung von Nervengewebe in Wasser herabsetzen, so vermuten wir, daß die herausdiffundierenden, quellungshemmenden Stoffe im wesentlichen solche Stoffe sind. Dann würde die Wirkung der Pia mater im Sinne einer Quellungshemmung durch ihre geringe Salzpermeabilität bedingt sein.

Unter den Salzen, deren Anwesenheit für den Quellungsprozeß von Belang ist, scheint dem Kochsalz eine besondere Bedeutung zuzukommen. Fehlt es in einer Lösung, so treten offenbar größere Mengen von Na-Salzen aus dem Nervengewebe aus. Die Folge davon ist eine erhöhte Quellbarkeit. Es ist unverkennbar, daß in den wenigen Lösungen, in denen NaCl gänzlich fehlt, die Quellung der Rückenmarke auffallend stärker ist, als in NaCl-haltigen Lösungen. Z. B. quoll in einer mit 0,7 % NaCl isotonischen 3,55 % Dextroselösung das Rückenmark mit Pia mater um 18,6 %, das Rückenmark ohne Pia mater um 104,3 % seines Anfangsgewichtes; dagegen behielt in einer dieser isotonischen 1,52 % Dextroselösung mit Zusatz von nur 0,4 % NaCl das Rückenmark mit Pia mater sein Anfangsgewicht bei, und das Rückenmark ohne Pia mater zeigte eine Gewichtszunahme von nur 9,7 %.

Schon zur Erklärung des verschiedenartigen Verlaufes der Oxydationsprozesse bei An- und Abwesenheit der Pia mater

hatten wir eine Semipermeabilität der letzteren herangezogen (cf. l. c.). Wir sahen die beim piaumhüllten Rückenmarke in hypertonischen NaCl-Lösungen auftretende Wasserentziehung als die unmittelbare Ursache für die Steigerung der Oxydationsvorgänge und für die Erhöhung und den darauf folgenden Verlust der Reflexerregbarkeit an, die beim piafreien Rückenmarksgewebe fehlt, weil das NaCl hier frei eindringen kann. Vergleichende Wägeversuche hatten uns gezeigt, daß die Pia mater in der Tat als semipermeable, für NaCl nicht oder schwer durchgängige Membran wirkt.

Nun haben wir durch eine Reihe neuer Versuche direkte Beweise der geringen Salzpermeabilität der Pia mater durch Färbung zu erbringen gesucht.

Man kann nämlich das Eindringen gewisser gefärbten Ionen in die Rückenmarksubstanz an Querschnitten makroskopisch verfolgen oder auch ungefärbte Ionen im Gewebe sichtbar machen, indem man die dazu angelegten Querschnitte in Lösungen taucht, die mit den farblosen Ionen gefärbte Verbindungen geben. So kann man z. B. das Eindringen des Ferri- und Ferroions auf Rückenmarksquerschnitten nach ca. 20stündigem Verweilen in 1% Lösungen deutlich an der intensiv braunen Färbung des Nervengewebes verfolgen, die man noch deutlicher machen kann, wenn die Querschnitte in eine verdünnte salpetersaure Rhodankaliumlösung oder auch eine Ferrocyankaliumlösung taucht, zwecks Bildung von blutrotem Eisensulfocyanat bzw. Eisenferrocyanid (Berlinerblau). Wendet man die beiden letzten Farbenreaktionen an, so kann man schon nach 2—4 Std. deutlich sehen, wie weit das Eisensalz in das Nervengewebe eingedrungen ist.

Diese Versuche lassen sich auch so modifizieren, daß man nach etwa 4stündigem Verweilen in 0,3% NaCl + 0,42% $FeCl_3$-Lösung die Pia mater abzieht. Letztere färbte sich dann in Kaliumsulfocyanatlösung z. B. intensiv, während das soeben von der Pia mater befreite Nervengewebe darin rein weiß blieb. Das Nervengewebe des von vornherein piafreien Rückenmarkes dagegen färbte sich nach 4stündigem Verweilen in der gleichen Fe_2Cl_6-haltigen NaCl-Lösung intensiv braunrot. Auf einem jetzt angelegten Querschnitte konnte man deutlich sehen, daß die Ferroionen von allen Richtungen der Peripherie gleich-

mäßig eine bestimmte — in dieser beschränkten Zeit allerdings nur kleine Strecke — ins Innere des Gewebes eingedrungen waren.

Aber auch weniger giftig wirkende Salze, z. B. NH_4Cl, kann man auf ihrem Wege ins Rückenmark sichtbar machen durch Eintauchen in Neßlers Reagens (eine mit Kalilauge versetzte Lösung von Merkurijodid in Jodkalium), das die von Ammoniumionen durchdrungenen Gewebe intensiv gelbbraun färbt.

Bei allen diesen Färbeversuchen konnten wir deutlichst feststellen, daß sich im Rückenmark mit Pia mater auf diesem Wege ausnahmslos im Innern entweder gar keine oder in weit schwächerem Maße eingedrungene Ionen nachweisen ließen als im pialosen Rückenmark. Daraus geht hervor, daß die Pia mater ein Hindernis für den Salzeintritt und umgekehrt offenbar auch für den Salzaustritt aus dem Rückenmark darstellt.

Unter diesem Gesichtspunkte wird das am Schlusse der Versuche im Vergleich mit dem piabekleideten Rückenmarke beträchtlich höhere Gewicht des piafreien Rückenmarks verständlich. Die Pia mater hindert die im Rückenmarksgewebe normal vorhandenen quellungshemmenden Stoffe (vorwiegend Salze) am Austritt in die Lösung und behindert rein mechanisch die Quellung, indem sie der mit letzterer einhergehenden Volumvermehrung keinen Raum gibt.

Gestützt auf die erwähnten Permeabilitätsversuche mit gefärbten Ionen bzw. mit Bildung gefärbter Verbindungen, glauben wir in NaCl-haltigen hypertonischen Lösungen die Pia mater als mehr oder minder semipermeable Membran betrachten und die in diesen Versuchen beobachteten Gewichtsabnahmen als vorwiegend osmotisch bedingt auffassen zu müssen. Es werden in diesen Fällen infolge der geringen und schweren Salzpermeabilität der Pia mater sich die höheren osmotischen Drucke der Lösungen gegenüber dem Rückenmarksgewebe in Wasserverschiebungen aus letzterem in die Lösungen geltend machen. Für die in isotonischen $MgCl_2$-Lösungen beobachteten Gewichtsabnahmen der piabekleideten Rückenmarke müßte man wohl annehmen, daß die stark quellungshemmende Wirkung der Mg-Ionen trotz ihres geringen Durchtritts durch die Pia

mater zum Nervengewebe die geringen Entquellungen hervorruft. Doch möchten wir von weiteren Erklärungsversuchen dieser offenbar recht komplizierten Erscheinungen absehen, da auf hypothetischen Grundlagen basierende Spekulationen es uns zu wenig aussichtlich erscheinen lassen, der Lösung des Problems näher zu kommen.

Am Schlusse unserer Betrachtungen sei, wie schon in der früheren Mitteilung, nochmals darauf hingewiesen, daß im piafreien Rückenmark, im lipoidreichsten Organe des Körpers, die Lipoide für die Permeabilitätsverhältnisse offenbar gar keine Rolle spielen, da die einzigen osmotischen Wasserverschiebungen in hypertonischen Lösungen durch die Anwesenheit der Pia mater bedingt sind, deren Lipoidgehalt im Verhältnis zu dem der weißen Substanz des Rückenmarks jedenfalls verschwindend gering ist.

V. Zusammenfassung.

1. Beim Verweilen des isolierten piafreien Froschrückenmarks in neutralen iso- und hypertonischen Lösungen von Elektrolyten, Nonelektrolyten und Kombinationen beider ist niemals eine Gewichtsabnahme, selten Gewichtskonstanz, fast stets eine Gewichtszunahme zu beobachten, die als echte, kolloidale Quellungserscheinung aufzufassen ist.

2. Alle Elektrolyten und Nonelektrolyten verringerten in allen untersuchten Kombinationen und Konzentrationen ausnahmslos das in Aqua destillata erreichte Quellungsmaximum des Rückenmarks.

3. Je stärker die Elektrolytkonzentration ist, um so ausgesprochener kommen die quellungshemmenden Eigenschaften der Ionen zur Geltung, doch verringern schon geringe Zusätze von NaCl zu Aqua destillata die Quellung bedeutend, während sehr viel stärkere Konzentrationen eine relativ viel schwächere Erniedrigung bewirken.

4. Die Quellungsprozesse, deren Geschwindigkeit mit steigendem Quellungsgrade abnimmt, zeigen eine sehr weitgehende Reversibilität.

5. Die zweiwertigen Kationen wirkten auf piafreies Rückenmarksgewebe stärker quellungshemmend als die Anionen.

6. Mehrwertige Kationen zeigen das bekannte gegensätz-

liche Verhalten gegenüber einwertigen, insofern Mg und Ca viel stärker quellungshemmend wirkten als Na, K und NH_4 (beim Rückenmark mit Pia mater sogar entquellend!).

7. Die das Rückenmark umhüllende intakte Pia mater steigert den spezifisch quellungshemmenden Einfluß der Leiter und Nichtleiter. Bedingt wird diese Wirkung aller Wahrscheinlichkeit nach teils rein mechanisch, teils durch eine Verhinderung bzw. Verminderung des Herausdiffundierens quellungshemmender Stoffe (vorwiegend Salze) aus dem Nervengewebe infolge der geringen Salzpermeabilität der Pia mater. Letztere ist indirekt schon früher durch Wägeversuche, jetzt auch direkt durch Färbung erwiesen worden.

8. Die Lipoide sind für die Permeabilitätsverhältnisse des piafreien Rückenmarkes offenbar ganz belanglos, da die einzigen anscheinend osmotisch bedingten Gewichtsänderungen in hypertonischen, NaCl-haltigen Lösungen nur durch die Anwesenheit der Pia mater hervorgerufen werden.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. Winterstein meinen herzlichen Dank abzustatten für die Anregung zu dieser Arbeit und die dauernde Förderung, die er ihr hat zuteil werden lassen.

Berichtigung.

In der Arbeit „Die elektrometrische Titration ..." von L. Michaelis in Bd. 79 lies auf Seite 31, Zeile 6 von unten: „unverdünnten" statt „verdünnten".

Autorenverzeichnis.

Abelin, J. Nachweis der Stoffwechselwirkung der Schilddrüse mit Hilfe eines eiweißfreien und jodarmen Schilddrüsenpräparates. S. 259.

Asher, Leon. Beiträge zur Physiologie der Drüsen. XXIX. S. 259.

Bau, Arminius. Zur Frage der Konstitution des Amygdalins. S. 159.

Brahm, C. Über Resorption und Umsatz abnorm großer Gaben von Rohrzucker und Invertzucker. S. 242.

Christiansen, E., siehe Henriques.

Chrząszcz, T., und A. Joscht. Über die Verschiebung einzelner amylolytischer Kräfte der Malzamylase und deren Verhalten beim Aufbewahren in Gegenwart verschiedener Reagentien. S. 211.

Dernby, K. G. Die proteolytischen Enzyme der Pinguicula vulgaris. S. 152.

Feigl, Joh. Zur Frage der Restreduktion des Blutes in Beziehung zu den reduzierenden Komponenten des Reststickstoffs. (Ergänzung.) S. 330.

Friedemann, Ulrich. Über heterophile Normalamboceptoren. Ein Beitrag zur Lehre von der Entstehung der normalen Antikörper. S. 333.

— und Alexandra Schönfeld. Über die physikalisch-chemischen Bedingungen der Leukocytenbewegung. (Emigration der Leukocyten, Chemotaxis, Phagocytose.) S. 312.

Hasselbalch, K. A. Über die wahre Natur der „acidotischen Konstitution" des Neugeborenen. S. 251.

Henriques V., und E. Christiansen. Untersuchungen über den Ammoniakgehalt des Blutes. II. S. 297.

Jacoby, Martin. Über Fermentbildung. II. S. 357.

Joscht, A., siehe Chrząszcz.

Matula, Johann, siehe Pauli.

Pauli, Wolfgang, und Johann Matula. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide XXI. Über Silbersalzproteine. S. 187.

Rippstein, Erwin. Experimentelle Untersuchungen über das Wesen der Bergkrankheit. S. 163.

Schönfeld, Alexandra, siehe Friedemann.

Schulemann, Werner. Die vitale Färbung mit sauren Farbstoffen in ihrer Bedeutung für Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie. S. 1.

Stutzer, A. Ein Beitrag zur Biochemie der Pflanzen. S. 143.

Unger, Rudolf. Über physikalisch-chemische Eigenschaften des isolierten Froschrückenmarks und seiner Gefäßhaut. S. 364.

CHEMISTRY LIBRARY

CHEMISTRY LIBRARY

JOURNAL
Does Not Circulate

ALF Collections Vault
3 0000 091 339 006